

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

PATOGĒNU PREVALENCE MIGRĒJOŠO PUTNU ĒRCĒS
2018. GADĀ PAPĒ

Bakalaura darbs

Autore: Alise Birnbauma

Stud. apl. Nr. ab19187

Darba vadītājas: MSc. biol. Lauma Freimane un

MSc. biol. Agne Namiņa

RĪGA 2022

SATURS

IEVADS	6
LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. <i>Ixodes ricinus</i> kā patogēnu vektors	7
1.2. Migrējošo putnu loma ērcu un to patogēnu izplatīšanā	8
1.3. Borēliju ģints baktēriju raksturojums un izplatība Eiropā un Latvijā	9
1.4. Babēziju ģints baktēriju raksturojums un izplatība Eiropā un Latvijā	11
1.5. Riketsiju ģints baktēriju raksturojums un izplatība Eiropā un Latvijā	13
1.6. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> raksturojums un izplatība Eiropā un Latvijā	16
1.7. <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i> raksturojums un izplatība Eiropā un Latvijā	18
MATERIĀLI UN METODES	21
2.1. Izmantotā aparatūra	21
2.2. Izmantotie reaģenti un praimeru	21
2.3. Pētāmais materiāls un DNS izdalīšana	23
2.4. Reālā laika PCR	24
2.4.1. Ērcu sugu identificēšana	24
2.4.2. <i>Ca. N. mikurensis</i> identificēšana ar qPCR	25
2.5. Divpakāpju PCR ērcu patogēnu identifikācijai	26
2.5.1. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> identificēšana ar PCR	27
2.5.2. <i>Babesia spp.</i> identificēšana ar PCR	28
2.5.3. <i>Borrelia spp.</i> identificēšana ar PCR	29
2.5.4. <i>Rickettsia spp.</i> identificēšana ar PCR	31
2.6. PCR produktu vizualizācija agarozes gēlā, izmantojot elektroforēzi	32
2.7. Paraugu sagatavošana Sangera sekvencēšanai	33
2.8. Datu apstrāde un statistika	35
REZULTĀTI UN DISKUSIJA	36
3.1. Putnu pārnēsātās ērces un to patogēni	36
3.2. <i>Borrelia spp.</i> prevalence	38
3.3. <i>Babesia spp.</i> prevalence	41
3.4. <i>Rickettsia spp.</i> prevalence	42
3.5. <i>A. phagocytophilum</i> prevalence	45
3.6. <i>Ca. N. mikurensis</i> prevalence	46
SECINĀJUMI	49
PATEICĪBAS	50
LITERATŪRAS SARAKSTS	51
PIELIKUMI	60

KOPSAVILKUMS

Šajā pētījumā ir analizēta *Borrelia spp.*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp.*, *Anaplasma phagocytophilum* un *Ca. N. mikurensis* prevalence 2018. gadā Papē ievāktās migrējošo putnu ērcēs. Izmantojot PCR metodes tika analizētas 788 *Ixodes ricinus* ērces, kas nolasītas no 369 putniem. Kur nepieciešams, patogēnus noteica līdz sugas līmenim, izmantojot sekvencēšanu. Tika konstatēts, ka minētie patogeni ir sastopami ar šādu prevelenci: *Borrelia sp.* – 7,86 %, *Babesia sp.* – 0,63 %, *Rickettsia spp.* – 11,41 %, *A. phagocytophilum* – 0,76 %, un *Ca. N. mikurensis* – 4,06 %. Proporcionāli visvairāk ērcu bija *Turdus* ģints, *Erithacus rubecula* un *Acrocephalus* ģints putniem, kuru ligzdošanas un barošanās uzvedība veicina ērcu parazitismu. Šī pētījuma rezultāti norāda uz nepieciešamību izpētīt konkrētu putnu sugu lomu kā iespējamiem patogēnu rezervuāriem.

Atslēgas vārdi: *Ixodes ricinus*, ērcu pārnēsātie patogēni, migrējošie putni, Latvija

SUMMARY

This study examines the prevalence of *Borrelia spp.*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp.*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in ticks collected from migrating birds in Pape, western Latvia in 2018. DNA samples from 788 *Ixodes ricinus* ticks, collected from 369 birds, were tested using PCR. When necessary, the samples were sequenced to identify the exact species. *Borrelia spp.* prevalence was found to be 7,86 %, *Babesia spp.* prevalence was 0,63 %, *Rickettsia spp.* prevalence was 11,41 %, *A. phagocytophilum* prevalence was 0,76 %, and *Ca. N. mikurensis* prevalence was 4,06 %. The bird species carrying the highest proportion of ticks were the *Turdus spp.*, *Erithacus rubecula* and *Acrocephalus spp.*. This is to be expected as they are exposed to tick infestations in their feeding and nesting habitats. Further studies are needed to assess the role of specific bird species as possible pathogen reservoirs.

Keywords: *Ixodes ricinus*, tick-borne pathogens, migratory birds, Latvia

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

PCR – polimerāzes ķēdes reakcija

qPCR – kvantitatīvā reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija

rRNS – ribosomālā RNS

gltA – citrātu sintāzi kodējošais gēns

groEL – šaperonīnu kodējošais gēns

ITS2 – nekodējošās DNS 2. reģions ribosomas mazajā subvienībā (*internal transcribed spacer*)

sp. – suga

spp. – sugas

Ca. – *Candidatus*

I. ricinus – *Ixodes ricinus*

I. persulcatus – *Ixodes persulcatus*

D. reticulatus – *Dermacentor reticulatus*

A. phagocytophilum – *Anaplasma phagocytophilum*

Ba. – *Babesia*

Bo. – *Borrelia*

Bo. burgdorferi s. l. – *Borrelia burgdorferi sensu lato* (plašākā nozīmē – sugu grupa)

Bo. burgdorferi s. s. – *Borrelia burgdorferi sensu lato* (šaurākā nozīmē – viena suga)

Ca. N. mikurensis – *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

R. – *Rickettsia*

M. arvalis – *Microtus arvalis*

M. oeconomus – *Microtus oeconomus*

IEVADS

Ērces ir daudzu cilvēkiem un citiem dzīvniekiem patogēnu mikroorganismu vektori, kuru izplatību ietekmē sarežģītas ekoloģiskās attiecības. Ērcu un to patogēnu areālu ietekmē klimatiskie apstākļi, kas jo sevišķi mūsdienās strauji mainās, un to saimniekorganismu izplatība un migrācija. Putni gan ikdienā, gan sezonālu migrāciju laikā pārvar lielus attālumus, līdz ar to pārvietojot arī uz tiem parazitējošās ērces. Tādējādi jaunā teritorijā, ja vien to atļauj citi ekoloģiskie apstākļi, var nokļūt un izdzīvot gan jaunas ērcu sugas, gan iepriekš nebijuši patogēni, ko tās pārnēsā. Putniem nolasītu ērcu patogēnu analīze ļauj gūt priekšstatu par šo patogēnu izplatību reģionā, kā arī uzzināt, kāda ir konkrētu putnu sugu loma noteiktu patogēnu populāciju uzturēšanā.

Pētāmā problēma: Patogēnu (*Borrelia spp.*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp.*, *A. phagocytophilum*, *Ca. N. mikurensis*) izplatība ērcēs, kas ievākstas no putniem Papes dabas parkā 2018. gadā rudens migrācijas laikā.

Darba mērķis: Izmantojot molekulārās bioloģijas metodes un datu apstrādes programmas, noteikt dažādu patogēnu īpatsvaru ērcēs no 2018. gada migrējošajiem putniem, noteikt koinfekcijas un apkopot statistiku par konkrētu sugu putnu lomu ērcu patogēnu izplatīšanā.

Hipotēze: Migrējošo putnu ērcēs no 2018. gada tiks konstatēta visu minēto patogēnu (*Borrelia spp.*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp.*, *A. phagocytophilum*, *Ca. N. mikurensis*) klātbūtne, kā arī būs novērojamas koinfekcijas, un būs konstatējamās putnu sugas ar lielāku lomu ērcu un to patogēnu pārnēsāšanā.

Darba uzdevumi:

1. Apkopojot datus par putniem, no kuriem noņemtas ērces, noskaidrot konkrētu putnu sugu lomu ērcu un to patogēnu izplatīšanā un interpretēt iegūtos rezultātus reģionālā kontekstā.
2. Noteikt sekojošo patogēnu īpatsvaru ērcēs un interpretēt rezultātus līdzīgu pētījumu kontekstā:
 - a. *Borrelia spp.* (identificējot līdz sugas līmenim);
 - b. *Babesia spp.* (identificējot līdz sugas līmenim);
 - c. *Rickettsia spp.* (identificējot līdz sugas līmenim);
 - d. *Anaplasma phagocytophilum*;
 - e. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*.
3. Apkopot datus par koinfekcijām, identificēt izplatītākās patogēnu kombinācijas un izskaidrot iespējamās cēloņus.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. *Ixodes ricinus* kā patogēnu vektors

Ganību ērces (*Ixodes ricinus*) dzīves ciklā ir trīs aktīvas stadijas, kurās ērcēi ir nepieciešams baroties ar asinīm, – kāpura stadija, nimfa un pieaudzis īpatnis – un parasti ērce pabeidz savu dzīves ciklu divu līdz trīs gadu laikā. *I. ricinus* ir daudzi iespējamie saimniekorganismi, un tie ir atkarīgi no ērces attīstības stadijas. Kāpura un nimfas stadijās ērces tipiski parazitē uz grauzējiem un putniem, kas meklē barību tuvu zemei, un šiem saimniekorganismiem praktiski nav raksturīga pieaugušu ērcu piesūkšanās (Estrada-Peña et al. 2005). Saimniekorganisma iespējamība inficēties ar ērces pārnestu patogēnu ir atkarīga no barošanās laika, siekalu izdalīšanās un asiņu uzņemšanas, kā arī paša patogēna, piemēram, ērcu encefalīta vīruss saimniekorganismā iekļūst teju uzreiz, bet inficēšanās risks ar *Borrelia burgdorferi* pieaug līdz ar piesūkšanās laiku (Wilhelmsson et al. 2013). Lielākajai daļai ērcu pārnēsāto slimību pastāv citu saimniekorganismu rezervuāri dabā (Dantas-Torres et al. 2012).

Posmkāju izplatīto infekciju slimību gadījumā var runāt par dažādiem patogēna pārneses veidiem pašā vektororganismā. Viens no tiem ir starpstadiju (*transstadial*) pārnese, kad patogēns ērcē vai citā posmkājī savairojas un var izplatīties tālāk tā nākamajā attīstības posmā, un tā ir pierādīta gan *Borrelia* ģints baktērijām, *Rickettsia* ģints baktērijām un *A. phagocytophilum* (Hauck et al. 2020). Pastāv arī patogēnu pārneses veids, kurā inficēta mātīte nodod tos saviem pēcnācējiem (*transovarial*) (Burgdorfer, Varma 1967). Transovariālajai pārnesei var būt atšķirīga efektivitāte jeb tas, cik procentu no inficētas mātes pēcnācējiem arī būs ar patogēna klātbūtni organismā, un laboratorijas apstākļos *Rickettsia* ģints patogēniem šīs pārneses efektivitāte ir līdz pat 100 % (Socolovschi et al. 2009). *Borrelia* ģints baktērijām transovariālās pārneses efektivitāte atšķiras, atkarībā no patogēnu sugas, bet *A. phagocytophilum* gadījumā transovariālā pārnese ir ļoti zema vai pat pilnīgi neefektīva (Hauck et al. 2020). Pētījumā, kurā tika analizēti nesen izšķīlušies un vēl neēduši ērcu kāpuri dabā, tika gūts apstiprinājums, ka *Rickettsia* ģints un *Borrelia* ģints baktērijas tiek pārnestas no ērcu mātītēm uz pēcnācējiem, un retos gadījumos iespējama arī *Anaplasma phagocytophilum* transovariālā pārnese (Hauck et al. 2020).

Patogēnu pārnese no vienas ērces citai, vairākām ērcēm vienlaikus barojoties pie viena un tā paša organisma un bez sistēmiskas infekcijas kā priekšnoteikuma, ir aprakstīta gan *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*s. l.*), gan ērcu encefalīta vīrusa gadījumā (Voordouw 2015). Infekcijas pārneses veids, kopīgi barojoties (*co-feeding*), atšķiras no sistēmiskas infekcijas – patogēns tikai lokāli iekļūst audos, un inficēties var tikai fiziski tuvu esošas citas ērces, kas barojas tajā pašā laikā; šādos gadījumos var novērot, ka saimniekorganismā neattīstās reakcija

pret patogēnu (Voordouw 2015). *Anaplasma* ģintī ir novērotas kopīgās barošanās atšķirības, atkarībā no sugas – tā ir izplatīta *Anaplasma phagocytophilum* gadījumā (Voordouw 2015).

Saistībā ar posmkāju pārnēsāto patogēnu koinfekcijām pastāv teorijas par evolucionārām priekšrocībām, ko tie sniedz, piemēram, ka simbiotiskas baktērijas sugas esamība organismā samazina iespējas inficēties ar kādu citu, virulentāku tās pašas ģints sugu (Perlman et al. 2006). Kādā citā pētījumā, kurā analizēta patogēnu klātbūtne ērcu “ligzdās” (tikko izšķīlušos kāpuru sakopojumos), bija augsti koinfekcijas rādītāji ar *Rickettsia spp.* un *Borrelia spp.*, un tika secināts, ka vienas šīs patogēnu ģints esamība kādā no “ligzdas” kāpuriem statistiski būtiski palielināja varbūtību, ka kāpuri inficēsies arī ar otras ģints patogēnu (Hauck et al. 2020). Apkopojot Eiropā veiktos pētījumus par koinfekcijām *I. ricinus* ērcēs, konstatētas *Bo. burgdorferi s.l.* un *A. phagocytophilum* koinfekcijas, kas, atkarībā no vietas, variē no 0,5 % līdz pat 13 % gadījumu (Swanson et al. 2006). Ir veikti atsevišķi pētījumi par babēziju koinfekcijām *I. ricinus* ērcēs; Polijā veiktā pētījumā 3 % nimfām tika konstatēta *Ba. microti* koinfekcija ar *Bo. burgdorferi s.l.*, un Francijā 2 % pētīto paraugu tika konstatēta babēziju koinfekcija ar *Bo. burgdorferi s.l.* (Swanson et al. 2006).

Ērcu pārnēsāto patogēnu izplatība ir atkarīga arī no sezonālajiem apstākļiem un klimata. Jau šobrīd var novērot, ka klimata pārmaiņas atstāj iespaidu uz *I. ricinus* izplatības areālu ziemeļos un ērcu aktivitātes sezonu, turklāt siltāku ziemu dēļ ir konstatēts ērcu encefalīta izplatības pieaugums ziemeļu reģionos (Gray et al. 2009). Tomēr precīzākai klimata pārmaiņu ietekmes modelēšanai attiecībā uz dažādu citu patogēnu, piemēram, borēliju, areāliem nepieciešams vairāk pētījumu, kas ņem vērā visus to ekoloģijā iesaistītos faktorus (Gray et al. 2009).

1.2. Migrējošo putnu loma ērcu un to patogēnu izplatīšanā

Dabiskos apstākļos ērces nevar patstāvīgi pievārēt lielus attālumus, piemēram, *I. scapularis* nimfas un pieaugušie indivīdi paši vairāku nedēļu laikā pārvietojas vidēji attiecīgi 2-3 m un 5 m attālumus (Carroll and Schmidtman 1996) un pieauguši *Dermacentor reticulatus* īpatņi bez saimniekorganismu palīdzības pārvietojas vidēji vien aptuveni 60 cm septiņu nedēļu laikā (Buzcek et al. 2017). Ērcu pārvietošanos starp dažādām dzīvotnēm lielākos attālumos nodrošina to saimniekorganismi – zīdītāji un putni (Buzcek et al. 2020). Ir daudz pētījumu jau kopš 1960. gadiem, kuri uzrāda, ka putni, jo sevišķi zvirbuļveidīgo kārtas, var būt ganību ērcu saimniekorganismi (Hasle 2013). Ziemeļamerikā veiktā teorētiskā pētījumā, kurā ar individuālu modelēšanas pieeju (*individual-based modeling approach*) modelēta putnu migrācijas ietekme uz *I. scapularis* izplatību, secināts, ka ērcu izplatībai būtiski ir šādi dziedātājputnu parametri – pārošanās areāls, migrācijas laiks un iespējamība uzlasīt ērces (Tonelli and Dearborn 2019). Zviedrijā veiktā pētījumā lēsts, ka putni pavasara

un rudens migrācijas laikā var pārvietot pat līdz attiecīgi 6,8 miljonus un 4,7 miljonus ērcu (Olsén et al. 1995).

Visvairāk ērcu piesūcas mežastrazdu ģints (*Turdus*) putniem, kas saistāms ar to barības meklēšanas paradumiem – tie daudz laika pavada uz zemes, kas palielina iespējamību kļūt par ērcu asins maltītes mērķi. Tādējādi šīs ģints putni arī ir nozīmīgāki inficētu ērcu pārvietotāji lielākos attālumos (Hasle et al. 2011). Lauka pētījumi Francijā identificējuši, ka no meža putniem visvairāk *I. ricinus* parazitē uz melnā mežastrazda (*Turdus merula*), sarkanrīklītes (*Erithacus rubecula*) un dziedātājstrazda (*Turdus philomelos*) (Marsot et al. 2012), sekojoši apstiprinot iepriekš minēto *Turdus* ģints putnu nozīmi. Atsevišķi pētījumi uzrāda ērcu piesūkšanās īpatsvara pieaugumu putniem, piemēram, Norvēģijā, salīdzinot ērcu parazitisma prevalenci migrējošajiem zvirbuļveidīgo kārtas putniem laika posmā no 1965. līdz 1970. gadam un no 2003. gada līdz 2005. gadam, konstatēts pieaugums no 4,2 % līdz 6,9 % (Hasle 2013). Polijā veiktā pētījumā par *Rickettsia* izplatību konstatēts, ka putnu sugas ar vislielāko inficētu ērcu īpatsvaru bija sarkanrīklīte (*Erithacus rubecula*), dziedātājstrazds (*Turdus philomelos*) un melnais mežastrazds (*Turdus merula*) (Biernat et al. 2016). Kaļiņingradas apgabalā veiktajā putnu ērcu pētījumā sugas ar vislielāko ērcu skaitu bija Polijas gadījumā minētās trīs sugas, kā arī žubīte (*Fringilla coelebs*) (Movila et al. 2013). Dānijā vislielākais ērcu skaits uz putnu bija sarkanrīklītei (*Erithacus rubecula*), melnajam mežastrazdam (*Turdus merula*) un erickiņam (*Phoenicurus phoenicurus*) (Klitgaard et al. 2019).

1.3. Borēliju ģints baktēriju raksturojums un izplatība Eiropā un Latvijā

Borrelia ģints baktērijas ir *Spirochaetales* kārtai, *Spirochaetia* klasei piederošas anaerobas baktērijas, kam raksturīga spirāles forma (8–30 μm garas un 0.2–0.5 μm diametrā), flagellas, un gram-negatīvs apvalks (Haake and Yang 2019). Borēliju ģints baktērijas iedala divās lielās grupās: atguļas tīfu (*relapsing fever*) izraisošās borēlijas un ar Laima slimību saistītās borēlijas (Haake and Yang 2019). *Borrelia* ģints baktērijas, kas var izraisīt Laima slimību, apkopo sugu kompleksā, ko dēvē par *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*s.l.*; no latīņu valodas – “plašākā nozīmē”), un tā iekļauj 20 sugas, un vēl trīs sugas ir izskatīšanas statusā (Wolcott et al. 2021). Attiecīgi *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (*s.s.*; no latīņu valodas – “šaurākā nozīmē”) apzīmē vienu no sugām šajā kompleksā. *Borrelia burgdorferi s.l.* izplatībā uz cilvēkiem obligāti nepieciešamas ērces kā patogēnu vektori (Wolcott et al. 2021). Eiropā izplatītākās cilvēkiem patogēnās *Borrelia burgdorferi s.l.* sugas ir *Bo. afzelii*, *Bo. garinii*, *Bo. burgdorferi s.s.*, *Bo. bavariensis* un *B. spielmanii* (Rizzoli et al. 2011), kā arī *Bo. bissetii*, *Bo. kurtenbachii*, *Bo. lusitaniae* un *Bo. valaisiana* (Gryczynska and Welc-Faleciak 2016). Epidemioloģiski aktuālas ir ne tikai *Borrelia burgdorferi s.l.* sugas, bet arī 1994. gadā Japānā

atklātā baktērija *Borrelia miyamotoi*, ko sākotnēji uzskatīja par nekaitīgu simbiotu, bet kas kopš 2011. gada ir zināms kā cilvēkiem patogēns mikroorganisms (Kubiak et al. 2021).

Lai inficētos ar Laima slimību, parasti nepieciešams, lai ērce būtu piesūkusies vismaz divas-trīs diennaktis (Murray and Shapiro 2010). Slimībai var iedalīt trīs stadijas, un sākumstadijā viens no biežākajiem simptomiem, kas parādās vidēji vienu līdz divām nedēļām pēc ērces piesūkšanās, ir raksturīgs plankums (*erythema migrans*) ērces piesūkšanās vietā (Murray and Shapiro 2010). Kad infekcija ir izplatījusies pa organismu, bieži sastopami tādi sistēmiski simptomi kā drudzis, muskuļu sāpes, galvassāpes un nogurums, bet nereti novērojama arī sejas nerva paralīze un meningīts (Murray and Shapiro 2010). Slimības vēlākās stadijas var izpausties kā artīts, īpaši, lielo locītavu, un encefalīts (Murray and Shapiro 2010). Laima slimības izpausmes atšķiras, atkarībā no tā, kura *Bo. burgdorferi s. l.* suga ir izraisījusi infekciju, piemēram, *Bo. burgdorferi s. s.*, ja netiek laikus ārstēta, biežāk izraisa artrītu, bet *Bo. garinii* ir saistīta ar palielinātu neiroloģisko simptomu risku (Murray and Shapiro 2010). Tipiskas slimības gaitas gadījumos pacientus ārstē ar antibiotiku – doksiciklīnu vai amoksicilīnu – kursu (Murray and Shapiro 2010).

Laboratorijas apstākļos izpētīts, ka *Borrelia burgdorferi s.l.* pēc uzņemšanas iekļūst ērces gremošanas sistēmas sienīnās, tad hemolimfā, un ceturtajā dienā pēc inficēto asiņu maltītes tās strauji savairojas ērces siekalu dziedzeros, kā arī nokļūst mātītes olšūnās (Monin et al. 1989). Laboratorijas apstākļos ir uzrādīta *Borrelia burgdorferi s.l.* starpstadiju pārnese *I. ricinus* ērcēs, kā arī patogēna pārnese no inficētas ērces pēcnācējiem, taču gan starpstadiju pārnese, gan transovariālā pārnese ir efektīva mazāk nekā pusē gadījumu (Monin et al. 1989). Taču jaunākie pētījumi liek apšaubīt pieņēmumus par *Bo. burgdorferi s.l.* transovariālo pārnesei – *I. persulcatus* ērcēs tā, visticamāk, nenotiek, un iepriekšējie rezultāti, kuros uzrādīta transovariālā pārnese, ir saistīti ar nepareizu sugas interpretāciju – tā notiek *Bo. miyamotoi* gadījumā (Rollend et al. 2013). Literatūrā ir aprakstīta arī *Bo. burgdorferi s.l.* pārnese kopīgas barošanās (*co-feeding*) laikā, un šāda sistēma esot efektīvāka Eiropā izplatītajā kombinācijā ar *I. ricinus* un *Bo. afzelii*, salīdzinot ar *I. scapularis* un *Bo. burgdorferi s.s.*, kas ir raksturīgāka Amerikā (Voordouw 2015). Izpētīts, ka kopīgās barošanās efektivitāte infekcijas pārnesei ir atkarīga no iesaistīto ērcu attīstības stadijas – borēliju pārnese no inficētas nimfas uz neinficētu kāpuru ir pat līdz trīsdesmit reišu izplatītāka nekā no inficētas nimfas uz neinficētu nimfu (Voordouw 2015).

Borēlijām savvaļā ir mugurkaulnieku rezervuāri. Polijā 20 gadu garumā veiktā pētījumā ir konstatēts, ka putni, konkrētāk, melnais mežastrazds (*Turdus merula*), ir *Bo. garinii*, *Bo. valaisiana* un *Bo. burgdorferi s.s.* rezervuāri (Gryczynska and Welc-Faleciak 2016). Šajā pašā pētījumā konstatēta arī iepriekš putnu ērcēs nenovērotu sugu parādīšanās, piemēram, *Bo.*

afzelii ievērojamā daudzumā, kas agrāk tika asociēta ar grauzējiem, un pirmo reizi nelielā īpatsvarā putnu ērcēs konstatēta *Bo. spielmanii* (Gryczynska and Welc-Faleciak 2016). Zviedrijā veiktā putnu ērcu pētījumā no 2001. gadā ievāktiem paraugiem (n=1120) borēliju prevalence bija vien 1,4 % un dominējošā suga bija *Bo. garinii* (Comstedt et al. 2006). Putnu ērcēs, kas ievāktas 2009. gadā Norvēģijas dienvidos (n=815), *Bo. burgdorferi s.l.* bija izplatītākās patogēnu sugas ar prevalenci 6,1 % (no tiem – 60 % *Bo. garinii*, 18 % *Bo. valaisiana*, 18 % *Bo. afzelii* un 2 % *Bo. burgdorferi s. s.*), un vienā gadījumā (0,1 %) konstatēta arī *Bo. miyamotoi* (Pedersen et al. 2020). Dānijā pirmo reizi *Bo. spielmanii* konstatētas 2012. gadā ievāktās ērcēs ar prevalenci 1 % (Michelet et al. 2014), un jau 2016. gada putnu ērcēs tā bija visizplatītākā borēliju suga ar prevalenci 15,1 % (Klitgaard et al. 2019). Dānijas putnu ērcu pētījumā no melnā mežastrazda (*Turdus merula*) nolasītajās ērcēs bija visvairāk *Bo. garinii* un *Bo. valaisiana*, kas saskan ar iepriekš aprakstīto *Turdus merula* lomu šo patogēnu izplatīšanās ciklā (Klitgaard et al. 2019). Igaunijas putnu ērcu pētījumā (2006.-2009. gads, n=249) *Bo. burgdorferi s.l.* prevalence bija 4,4 % un pozitīvie gadījumi bija ērcēs, kas noņemtas no mežastrazdu (*Turdus*) un zīlīšu (*Parus*) ģints putniem (Geller et al. 2013). Arī tuvā reģionā – Kaļiņigradas apgabalā – 2009. gada putnu ērcēs (n=135) *Borrelia spp.* prevalence bija 5,9 % ar *Bo. garinii*, *Bo. afzelii* un *Bo. valaisiana* kā dominējošajām sugām (Movila et al. 2012).

Latvijā veiktajā pētījumā ar ērcēm, kas ievāktas no migrējošajiem putniem 2009. gadā, *Borrelia* ģints baktērijas konstatētas 18 % (17 no 93) paraugu (Capligina et al. 2014). Sekvencējot tika identificētas divas sugas gandrīz vienādā paraugu skaitā – *Borrelia garinii* un *Borrelia valaisiana* –, bet *Borrelia afzelii* netika konstatētas (Capligina et al. 2014). Visu Latvijas teritoriju aptverošajā pētījumā, kurā tika analizēta patogēnu prevalence biotopu ērcēs 2017.-2019. gadā, konstatēti 15,99 % pozitīvi borēliju gadījumi *I. ricinus* ērcēs un 23,42 % - *I. persulcatus* ērcēs (Capligina et al. 2020). Tika identificētas šādas sugas: *Bo. afzelii*, *Bo. burgdorferi (s.s.)*, *Bo. garinii*, *Bo. lusitaniae* un *Bo. valaisiana*, no kurām visizplatītākā bija *Bo. afzelii* ar 9,35 % prevalenci *I. ricinus* ērcēs un 15,19% prevalenci *I. persulcatus* ērcēs, bet nākamā izplatītākā suga bija *Bo. garinii* (2,58 % *I. ricinus* un 8,86 % *I. persulcatus* ērcēs) (Capligina et al. 2020). *Bo. lusitaniae*, *Bo. valaisiana* un *Bo. burgdorferi (s.s.)* tika konstatētas attiecīgi 2,5%, 1,22% un 0,6% *I. ricinus* ērcu (Capligina et al. 2020).

1.4. Babēziju ģints baktēriju raksturojums un izplatība Eiropā un Latvijā

Babesia ģints ir eikariotiski viencelulārie organismi, kas pieder *Apicomplexa* kārtai – kuras visi pārstāvji ir parazītiski (Levine 1988). Babēzijas pieder *Piroplasmida* kārtai, un pirmos šīs ģints organismus 1888. gadā Rumānijā liellopu asinīs atklāja Viktors Babešs (*Victor Babeș*),

sākotnēji nosaucot par *Piroplasma bovis* (vēlāk tika pārdēvētas par *Babesia bovis*) (Levine 1988). Dažus gadu vēlāk ASV, pētot liellopu drudža cēloņus, Smits (*Smith*) un Kilborns (*Kilborne*) atklāja, ka babēzijas tiek pārnēsātas ar ērcēm (Levine 1988).

Babesia ģints parazitē dzīves ciklā nepieciešamas gan ērces kā vektors, gan mugurkaulnieki, to rezervuāri (Vannier and Krause 2012). Ērcu kāpuri un nimfas, barojoties ar inficētu grauzēju asinīn, uzņem gametocītus, kas seksuāli reproducējas ērces gremošanas traktā, tad radušās zigotas migrē uz ērces hemolimfu, kur tās nobriest par ookinetām (Vannier and Krause 2012). Ookinētas migrē uz ērces siekalu dziedzeriem, kur tās kļūst par neaktīviem sporoblastiem, savukārt nākamajā barošanās sezonā babēziju sporozoīti iekļūst nākamajā dzīvniekā, ar kuru ērce barojas (Vannier and Krause 2012). Sporozoīti iekļūst eritrocītos, kur tie iziet nākamās attīstības fāzes, līdz eritrocīts pārsprāgst un tie invadē citus eritrocītus (Vannier and Krause 2012).

Eiropā par galveno *Ba. capreoli* un *Ba. venatorum* saimniekorganismu uzskata stirnu (*Capreolus capreolus*), bet Zviedrijas dienvidos *Babesia divergens* ir bieži sastopama liellopos, savukārt *Ba. motasi* – aitās (Wilhemsson et al. 2021). *Ba. microti* ASV ir pamatā sastopama baltkāju pelē (*Peromyscus leucopus*), kurā arī ir pierādīta tās placentārā transmisija grauzēja pēcnācējiem, tādējādi veicinot šī patogēna rezervuāru uzturēšanu (Tufts and Diuk-Wasser 2018). Eiropā galvenais *Ba. microti* rezervuārs ir *Microtus* ģints grauzēji (strupastes), kuros, konkrētāk, *M. arvalis* un *M. oeconomus*, arī ir pierādīta vertikāla pārnese pēcnācējiem (Tołkacz et al. 2017).

Babēziju izraisītā saslimšana ir aktuāla veterinārmedicīnas problēma, jo īpaši attiecībā uz suņiem, kam tā var būt bīstama un pat letāla (Solano-Gallego et al. 2016). Suņu babeziozi izraisa divas morfoloģiski viegli atšķiramas sugas: *Ba. gibsoni* (izmērs 1.9-1.2 μm) un *Ba. canis* (izmērs 5.0-2.0/3.0 μm), un, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes, ir apstiprināts iedalījums trīs *Ba. canis* pasugās: *Ba. canis canis*, *Ba. canis vogeli*, *Ba. canis rossi* (Carret et al. 1999).

Babēzijas ir lielākoties pazīstamas kā dzīvnieku patogēni, taču pēdējos gados aizvien lielāka uzmanība tiek pievērsta cilvēku inficēšanās gadījumiem, ko var izraisīt *Ba. divergens*, *Ba. venatorum*, *Ba. microti* un *Ba. duncani* (Gray et al. 2010). ASV lielāko daļu saslimšanu cilvēkiem izraisa *Ba. microti* (atsevišķos gadījumos arī *Ba. duncani* vai *Ba. divergens*), savukārt Eiropā lielākajā daļā gadījumu infekcijas ierosinātājs ir bijis *Ba. divergens*, retāk – *Ba. venatorum* vai *Ba. microti* (Vannier and Krause 2012). Cilvēku inficēšanās gadījumos izpausmes ir no vieglām līdz smagām un pat letālām (Vannier and Krause 2012). Saslimšana sākas 1-4 nedēļas pēc inficētas ērces piesūkšanās (inkubācijas periods var būt ilgāks, ja inficēšanās ir notikusi no asins pārļiešanas), un ir raksturīgs nespēks un augsta temperatūra,

klīniskos izmeklējumos – anēmija (Vannier and Krause 2012). Līdzīgi kā patogēna grauzēju rezervuāru gadījumā, arī cilvēkos *Ba. microti* ir iespējams caur placentu nodot bērnam (Joseph et al. 2012). *Ba. microti* infekciju, īpaši, pacientiem ar novājinātu imunitāti, var efektīvi ārstēt ar klofazimīnu (Tuvshintulga et al. 2020).

Daudzos pētījumos netiek pārbaudīta ērcu inficētība ar babēzijām, un pētījumos, kuros nosaka šī patogēna klātbūtni, tā prevalence ir zema. Krievijā, Kaļiņingradas apgabala migrējošo putnu *I. ricinus* ērcēs no 2009. gada (n=135) identificēts tikai viens pozitīvs *Ba. venatorum* gadījums ar prevalenci 0,7 % (Movila et al. 2013). Taču arī ar karogošanas metodēm ievāktajās ērcēs tuvākajā reģionā babēziju īpatsvars ir zems; Baltkrievijā *I. ricinus* ērcēs tika konstatēti 0,9 % *Ba. microti* un 0,6 % *Ba. venatorum* (Reye et al. 2013). Norvēģijā veiktā pētījumā (2006.-2008. gads, n=1908) identificētas trīs babēziju sugas – *Ba. venatorum*, *Ba. divergens* un *Ba. capreoli* – ar kopīgo prevalenci 0,9 % (Øines et al. 2012). Zviedrijā veiktā putnu ērcu pētījumā 2009. gadā *I. ricinus* ērcēs (n=1051) tika konstatēts, ka babēziju prevalence ir 2,5 %, un tika identificētas trīs sugas – *Ba. venatorum* (58 %), *Ba. microti* (38 %) un *Ba. capreoli* (4 %) (Wilhemsson et al. 2021).

Latvijas migrējošo putnu ērcu analīzē, kas veikta no 2009. gadā ievāktajiem paraugiem, *Babesia* ģints patogēnu prevalence bija 4 % (4 no 93), un inficēti bija gan kāpuri, gan nimfas (Capligina et al. 2014). Sekvencēšanā tika noskaidrots, ka ir sastopamas trīs sugas: *Ba. divergens*, *Ba. microti* un *Ba. venatorum* (Capligina et al. 2014). Ar karogošanas metodi 2017.-2019. gadā ievāktajās ērcēs (n=4593) visu Latviju aptverošajā pētījumā, kurā tika apskatītas gan *I. ricinus*, gan *I. persulcatus*, gan *D. reticulatus* ērces, konstatēta atšķirīga *Babesia spp.* prevalence minētajās ērcu sugās, attiecīgi 2,53 %, 0,63 % un 0,34 % (Capligina et al. 2020). *I. ricinus* ērcēs, kurās bija vislielākā prevalence, tika identificētas četras sugas: *Ba. canis*, *Ba. microti*, *Ba. venatorum* un *Ba. capreoli*, bet *I. persulcatus* un *D. reticulatus* ērcēs tika konstatētas tikai divas sugas: *Ba. microti* un *Ba. canis* (Capligina et al. 2020). Salīdzinot abus Latvijā veiktos pētījumus, jāatzīmē, ka vienīgais 2009. gada putnu ērcēs konstatētais *Ba. divergens* gadījums netika vēlāk konstatēts lielāka mēroga pētījumos no biotopu ērcēm, kas varētu liecināt par šīs sugas reto sastopamību ērcēs Latvijā.

1.5. Riketsiju ģints baktēriju raksturojums un izplatība Eiropā un Latvijā

Rickettsijas (*Rickettsia* ģints) ir gram-negatīvas šūnu iekšienē rezidējošas baktērijas, kas pieder *Rickettsiales* kārtai, alfabroteobaktēriju klasei. Rickettsijas ir koki vai īsas nūjiņveida baktērijas 0,8-2,0 μm garumā un ar 0,3-0,5 μm diametru (La Scola and Raoult 1997). Tā kā *Rickettsiales* kārtas baktērijas ir iekššūnas parazīti ar maz fenotipiski diferencējamām īpašībām, molekulārās metodes - konkrēti, 16S rRNS analīze - ir ievērojami uzlabojušas

filoģenētisko attiecību noteikšanu šajā patogēnu kārtā (Raoult and Roux 1997). *Rickettsia* ģints iekļauj vismaz 27 apstiprinātas un aprakstītas baktēriju sugas, kā arī virkni vēl līdz galam neizpētītu šīs ģints sugu (Parola et al 2013). *Rickettsia* ģints klasifikācija ir mainījusies no iedalījuma trīs grupās uz iedalījumu četrās: tīfa grupa (TG), izsitumu tīfa (*spotted fever*) grupa (SFG), *Rickettsia belli* grupa, un *Rickettsia canadensis* grupa (Merhej et al. 2014). Savukārt plašākā grupa, SFG, ir iedalāma vēl četrās apakšgrupās: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia helvetica*, un *Rickettsia akari* (Merhej and Raoult 2010). Riketsijām raksturīgs mazs, evolucionāri reducēts genoms (1,1-1,5 Mbp), jo īpaši tām sugām, kuras ir sevišķi patogēnas mugurkaulniekiem, savukārt sugām, kuras ir mazāk virulentas vai ir endosimbionti, genoma reducēšanās ir notikusi mazākā mērā (Merhej and Raoult 2010).

Rickettsia ģints baktērijas ir pazīstamas kā iekšsūnu parazīti, kas var izraisīt dažāda smaguma saslimšanas cilvēkiem un citiem dzīvniekiem, un kuras pārnēsā asinssūcēji posmkāji (Raoult and Roux 1997), taču jaunākie pētījumi liecina, ka ne visas riketsiju sugas ir patogēnas mugurkaulniekiem (Merhej and Raoult 2010). Inficēšanās gadījumā inkubācijas periods ir no 6 līdz 10 dienām, un slimība izpaužas ar paaugstinātu temperatūru (39,5-40°C), galvassāpēm, muskuļu sāpēm, izsitumiem un palielinātiem limfmezgliem, inficētā koduma vietā ir raksturīga krevele, un simptomi ilgst divas līdz trīs nedēļas (Raoult and Roux 1997; Parola and Raoult 2001). Diagnostikā tiek izmantoti seroloģiski testi (taču pozitīvus rezultātus iegūst vien tad, kad slimība jau ir progresējusi aptuveni nedēļu), kā arī molekulārās metodes (La Scola and Raoult 1997). Šī iemesla dēļ ārstēšanu ar antibiotiku doksiciklīna kursu parasti uzsāk pirms infekcija ir laboratoriski apstiprināta (Parola and Raoult 2001).

Dažas riketsiju sugas (*R. prowazekii*, *R. conorii*, *R. typhi*) inficē un nogalina arī savus pārnēsātājus - posmkājus (šo sugu gadījumā - utis un blusas), taču lielākā daļa *Rickettsia* ģints baktēriju saviem saimniekorganismiem nekaitē (Merhej and Raoult 2010). Riketsijas vairojas ērcu siekalu dziedzeros un olnīcās, nodrošinot horizontālo pārnesei, asinssūcējam barojoties, kā arī vertikālo pārnesei uz pēcnācējiem (*vertical transovarial transmission*) (Merhej and Raoult 2010). Pateicoties vertikālajai pārnesei, arī ērces ir šo patogēnu rezervuāri, un ērcu izplatības areāls sekojoši nosaka riketsiju izplatības areālu (Parola and Raoult 2001).

Rickettsia ģints baktērijas ir izplatītas visā pasaulē un, tā kā ērces pašas nespēj tālu pārvietoties, to izplatībā uz jauniem areāliem liela nozīme ir ērcu saimniekorganismu migrācijai, un šajā ziņā vislielākos attālumus palīdz veikt migrējošie putni (Merhej et al. 2014). Kā konkrēti *I. ricinus* ērcēs sastopamās sugas sākotnēji tika aprakstītas *R. helvetica* un *R. monacensis* (Merhej and Raoult 2010), bet turpmākie pētījumi ir ļāvuši šo sarakstu papildināt ar *R. massiliae*, *R. raoultii*, *Candidatus Rickettsia moreli* un *Candidatus Rickettsia vini* (Parola et al 2013).

Publicēto pētījumu apraksti attiecībā uz *Rickettsia* ģints baktērijām Eiropā liecina, ka *Ixodes ricinus* ērcēs dominē *R. helvetica*, bet mazākā skaitā sastopamas arī citas sugas. Dānijā 2002.-2003. gadā ar karogošanas metodi ievāktajās ērcēs nimfas stadijā tika konstatēta riketsiju prevalence vidēji 4,7 %, un visas riketsijas piederēja sugai *R. helvetica* (Kantsø et al. 2010). Šajā pētījumā arī tika konstatētas prevalences atšķirības dažādos biotopos un gadalaikos - visvairāk inficēto ērcu bija ekotonos, salīdzinot ar mežiem, un maijā bija vairāk pozitīvo gadījumu nekā periodā no jūlija līdz oktobrim (Kantsø et al. 2010). Savukārt pētījumā Vācijā, Hamburgā tika konstatēta pretēja tendence sezonālītātē - vasaras un rudens mēnešos bija augstāka *R. helvetica* prevalence nekā aprīlī un maijā (May and Strube 2014). Baktēriju prevalence mainās arī pa gadiem, piemēram, vēlāk veiktā mazāka apjoma pētījumā Dānijā (192 ērces nimfas stadijā) *Rickettsia* ģints baktērijas tika konstatētas jau 13% paraugu, arī tikai *R. helvetica* (Svendsen et al. 2009). Dānijā 2016. gadā ievāktajās putnu ērcēs *Rickettsia* ģints baktērijas, arī pārsvarā *R. helvetica*, tika identificētas 10,6 % paraugu (Klitgaard et al. 2019). Norvēģijas dienvidos 2008. gadā ievāktajās putnu ērcēs *R. helvetica* tika konstatēta vien 0,4 % gadījumu, un šīs trīs inficētās ērces tikai ievāktas pavasara migrācijas laikā (Pedersen et al. 2020), bet 2001. gadā ievāktās putnu ērcēs Zviedrijā riketsiju prevalence bija 11,3 %, arī ar lielāku prevalenci pavasara migrāciju laikā (Elfving et al. 2010).

Polijā veiktā pētījumā par putnu ērcēm tika konstatēts, ka vismaz 17,4 % ērcu kāpuru un 18,7 % nimfu saturēja *Rickettsia* ģints baktērijas (Biernat et al. 2016). Lielākā daļa paraugu, ko varēja identificēt līdz sugas līmenis, bija *R. helvetica* (vismaz 12,7 % no visām pārbaudītajām ērcēm), bet vienā gadījumā - paraugā ar pūlotiem kāpuriem - tika konstatēta arī *R. monacensis* (Biernat et al. 2016). Ungārijā migrējošo putnu ērcēs, kas ievāktas 2013. gadā, bija augsta *Rickettsia* ģints prevalence - 51,4 % -, un, sekvencējot paraugus, tika konstatēts, ka *R. helvetica* prevalence ir 43,6 % un *R. monacensis* prevalence ir 7,9 %, un inficētas bija ērces gan nimfas, gan kāpura stadijā (Hornok et al. 2014). Vēl augstāka *Rickettsia* ģints baktēriju prevalence putnu ērcēs konstatēta pētījumā Vācijā, Hamburgā - 52,5 % (May and Strube 2014). Baltkrievijā veiktā pētījumā, kurā iekļautas gan *I. ricinus*, gan *D. reticulatus* ērces, *Rickettsia* ģints prevalence bija 24,4 %, no kurām lielākā daļa bija *R. helvetica*, taču konstatētas arī *R. monacensis* un *R. raoultii* (Reye et al. 2013). Igaunijā ar karogošanas metodi ievāktajās ērcēs vidēji 5,7 % paraugu bija *Rickettsia* ģints baktērijas, no kurām lielākā daļa - *R. helvetica*, bet arī pa vienai no *R. monacensis* un *Ca. R. tarasevichiae* (Katargina et al. 2015). Kaļiņingradas apgabalā 2009. gadā ievāktajās *I. ricinus* ērcēs (n=135) no putniem tika konstatētas tikai *R. helvetica* ar prevalenci 11,8 % (Movila et al. 2012). Dienvideiropā, Sardīnijā *Rickettsia* ģints baktēriju prevalence pētījumā ar salīdzinoši nelielu paraugu skaitu (185 ērces), kas ievāktas no dažādiem saimniekorganismiem, bija 16 % (Chisu et al. 2018).

Minētājā pētījumā Sardīnijā pirmo reizi tika molekulāri identificēta suga *R. raoultii* (Chisu et al. 2018).

Latvijā 2009. gadā ievāktajās migrējošo putnu ērcēs (n=93) no *Rickettsia* ģints sugām tika konstatēta tikai *R. helvetica* ar prevalenci 12 % (Capligina et al. 2014). Visu Latvijas teritoriju aptverošajā pētījumā 2017.-2019. gadā ar karogošanas metodi ievāktajās ērcēs vidējā *Rickettsia spp.* prevalence bija 19,46 %, un visvairāk inficētas bija *I. ricinus* ērces (Capligina et al. 2020). Dominējošā suga bija *R. helvetica*, kuras prevalence bija vislielākā tieši *I. ricinus* ērcēs (17,76 %), bet *R. raoultii* bija visvairāk sastopama *D. reticulatus* ērcēs (17,82 %), kamēr *I. ricinus* šīs baktērijas prevalence bija vien 2,11 % (Capligina et al. 2020). Trešā *Rickettsia* ģints suga, *R. monacensis*, kas samērā bieži bija sastopama iepriekš apskatītajos pētījumos citur Eiropā, tika konstatēta vien 5 paraugos jeb 0,13 % no analizētajām Latvijas biotopu ērcēm (Capligina et al. 2020). Balstoties uz šiem pētījumiem, var diezgan droši prognozēt, ka 2018. gada putnu ērcēs būs sastopama vismaz *R. helvetica*.

1.6. *Anaplasma phagocytophilum* raksturojums un izplatība Eiropā un Latvijā

Anaplasma phagocytophilum ir 0,5-1,0 μm lielas baktērijas ar gram-negatīvu šūnapvalku, tās ir obligāti iekššūnu parazīti, kas izraisa saslimšanu gan cilvēkiem, gan dzīvniekiem (Dumler et al. 2005). *A. phagocytophilum* inficē neitrofilus un citus granulocītus – patogēns šajās šūnās ir vizuāli pamanāms – un infekcijas rezultātā samazinās neitrofilu skaits un izmainās to funkcijas (Dumler 2012). Saslimšanas gadījumā pacientiem ir nespēks, paaugstināta temperatūra, galvassāpes un muskuļu sāpes, un bieži sastopamas patoloģijas asinsanalīzēs – pazemināts trombocītu un/vai leukocītu skaits, un paaugstināts aknu transamināžu līmenis (Dumler et al. 2005). Slimības gaita var būt smaga, un vairāk nekā trešdaļā simptomātisko/identificēto gadījumu ir nepieciešama hospitalizācija, mirstība sasniedz 0,6% (Dumler 2012). Ārstēšanā tiek izmantotas antibiotikas doksiciklīns (Dumler et al. 2005).

A. phagocytophilum ierosināto saslimšanu pirmo reizi aprakstīja kā veterinārmedicīnas fenomenu 1932. gadā Skotijā, un astoņus gadus vēlāk tika arī pirmo reizi aprakstīts *A. phagocytophilum* prototips (Woldehiwet 2010). Laika posmā no 20. gadsimta 40. līdz 80. gadiem šīs baktērijas ierosināto saslimšanu – sākotnēji dēvētu par “ērču ierosinātu drudzi” (*tick-borne fever*) – aitās un govīs detektēja un aprakstīja arī citās Apvienotās Karalistes daļās, Īrijā, Skandināvijā un citur Eiropā (Woldehiwet 2010). Amerikā infekcija pirmo reizi tika konstatēta un aprakstīta kā zirgu erlihioze, un patogēns tika pieskaitīts *Rickettsiales* baktēriju kārtai, *Ehrlichiae* dzimtai (Gribble 1970; Woldehiwet 2010). Izraisīto salīmšanu konstatēja arī suņiem (Maddewell and Gribble 1982; Woldehiwet 2010), bet salīdzinoši nesēn *A.*

phagocytophilum konstatēta arī kaķos ar klīniskiem simptomiem (Lappin et al. 2004). Kā jau minēts, patogēnu sākotnēji uzskatīja par relevantu vien veterinārmedicīnas sakarā, bet 1990. gadā ASV pirmo reizi tika molekulāri apstiprināta šī patogēna izraisīta smaga infekcija cilvēkiem (Chen et al. 1994).

A. phagocytophilum izraisītās slimības nosaukums ir bijis atšķirīgs, atkarībā no inficētajiem organismiem un novērotajām izpausmēm, un nosaukumā arī ir bijuši atspoguļotas tā laika zināšanas par infekcijas izraisītāju. Paša patogēna nosaukums laika gaitā ir mainījies no *Rickettsia phagocytophila* uz *Cytoecetes phagocytophila*, un pēc tam uz *Ehrlichia phagocytophila*, kamēr paralēli par zirgu saslimšanas izraisītāju uzskatīja *Ehrlichia equi* (Woldehiwet 2010). 16S rRNS kodējošā gēna sekvencēšana 1980. gadu beigās deva iespēju precizēt filoģenētiskās attiecības *Rickettsiales* kārtā, bet apstiprinājumu savai tagadējai filoģenētiskajai piederībai un līdz ar to šobrīd lietoto nosaukumu - *Anaplasma phagocytophilum* - ieguva vien 2001. gadā, kad tika arī noskaidrots, ka šī baktērija ir tas pats, kas iepriekš par atšķirīgiem patogēniem uzskatītie *E. phagocytophila* un *E. equi* (Dumler et al. 2001).

Patogēna vektors ir *Ixodes* ģints ērcēs, un inficētās ērcēs notiek tikai starpstadiju pārnese (Dumler et al. 2005). Taču nesens pētījums par vēl neēdušiem ērcu kāpuriem uzrādīja, ka retos gadījumos var notikt *A. phagocytophilum* nodošana no inficētas mātītes pēcnācējiem, bet tā kopumā uzskatāma par mazefektīvu (Hauck et al. 2020). *A. phagocytophilum* gadījumā ir efektīva arī patogēna pārnese no inficētas ērces uz citu kopīgas barošanās (*co-feeding*) laikā bez obligātas sistēmiskas infekcijas saimniekorganismā (Voordouw 2015). Eiropā būtiskākais vektors ir *I. ricinus*, bet ir uzrādīta arī *I. persulcatus* inficētība ar *A. phagocytophilum* (Woldehiwet 2010).

Patogēna izplatību un saglabāšanos nodrošina rezervuāri – ērcu saimniekorganismi, piemēram, sīki zīdītāji (Woldehiwet 2010). Putnu iespējamā loma kā *A. phagocytophilum* rezervuāriem nav stingri pierādīta – vienā ASV veiktā pētījumā, kurā tika analizēts vietējo zīdītāju un putnu sugu rezervuāru potenciāls, putnu sugas uzrādīja salīdzinoši zemu ērcu inficēšanas spēju (Keesing et al. 2012), bet agrāk veiktā pētījumā ir indikācijas, ka *Turdus migratorius* un *Catharus fuscescens* varētu būt *A. phagocytophilum* rezervuāri, bet pētījuma autori neizslēdz, ka pozitīvie rezultāti ērcu kāpuros varētu būt no inficēšanās kopīgas barošanās (*co-feeding*) laikā (Daniels et al. 2002).

Šogad publicētā metaanalīzē par *A. phagocytophilum* izplatību secināts, ka vidējā prevalence globāli ir 4,76 %, un baktērija ir konstatēta kopumā 33 valstīs visos kontinentos (Karshima et al. 2022). Polijā vairākos pētījumos, kas publicēti 2004.-2008. gadā migrējošo putnu ērcēs un asinīs netika konstatēta *A. phagocytophilum* klātbūtne (Biernat et al. 2016), un

arī Dānijā 2016. gadā ievāktajās putnu ērcēs šis patogēns netika atrasts (Klitgaard et al. 2019). Ungārijas putnu ērcu pētījumā no 2013. gada *A. phagocytophilum* tika konstatēta tikai vienā ērcē no 140 pētītajām (Hornok et al. 2014). No putniem nolasītajās ērcēs Hamburgā 2011. gadā *A. phagocytophilum* tika konstatēta vidēji 3,6 % paraugu (taču ar lielām atšķirībām dažādās ievākšanas vietās pilsētas teritorijā), un patogēna prevalencē netika novērotas sezonālas svārstības (May and Strube 2014). Norvēģijas dienvidos 2008. gadā ievāktajās putnu ērcēs konstatētā *A. phagocytophilum* prevalence bija 0,9 % ar nedaudz lielāku īpatsvaru pavasara migrācijas laikā ievāktajām ērcēm, salīdzinot ar rudens migrāciju (Pedersen et al. 2020). Savukārt, Zviedrijā veiktā pētījumā 11,5 % paraugu bija pozitīvi, taču jāņem vērā, ka šajā pētījumā ērces, arī nimfas stadijā, tika pūlotas, tādējādi reālais īpatsvars ir starp 1,3 un 15 % (Severinsson et al. 2010). Igaunijā veiktā putnu ērcu pētījumā 2006.-2009. gadā tika identificēta tikai viena ar *A. phagocytophilum* inficēta ērce jeb 0,4 % paraugu (Geller et al. 2013). Kaļiņigradas apgabalā šī patogēna prevalence putnu ērcēs (2009. gadā, n=135) bija 1,5 % (Movila et al. 2013). Baltkrievijā ar karogošanas metodi un no dzīvniekiem noņemtajās ērcēs vidējā *A. phagocytophilum* prevalence bija 2,2 %, taču pētījumā tika konstatēti arī šī patogēna “karstie punkti”, kur prevalence bija 12,5-17,2 % (Reye et al. 2013). Kopumā, apskatot avotus, jāsecina, ka *A. phagocytophilum* Eiropā nav ar augstu prevalenci (<4 %), bet atsevišķos reģionos ir iespējami šī patogēna perēkļi ar daudz augstākiem rādītājiem.

Latvijā 2009. gadā Papē ievāktajās migrējošo putnu ērcēs *A. phagocytophilum* prevalence bija 2,2 % (2 no 93) (Capligina et al. 2014). Savukārt biotopu ērcēs 2017.-2019. gadā *A. phagocytophilum* tika identificēta 1,2 % *I. ricinus* ērcu, galvenokārt Latvijas rietumu, centrālajā un ziemeļu daļā (Capligina et al. 2020).

1.7. *Candidatus Neohrlichia mikurensis* raksturojums un izplatība Eiropā un Latvijā

Ca. N. mikurensis ir baktērija, kas izpētīta un aprakstīta 2004. gadā no materiāla, kas iegūts Japānā, Mikura salā no pelēko žurku (*Rattus norvegicus*) šūnām (Kawahara et al. 2004). Šī baktērija pieder *Anaplasmatocae* dzimtai (α -proteobaktēriju klasei, *Rickettsiales* kārtai), kurai pieder tādas zināmas patogēnu ģintis kā *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Aegyptianella* un *Wolbachia*. Šīs dzimtas baktērijas ir obligāti eikariotu iekššūnu parazīti, kas mitinās šūnu vakuolās (Dumler et al. 2001). Filoģenētiski *Ca. N. mikurensis* atrodas starp *Ehrlichia* un *Anaplasma* ģints baktērijām (Naitou et al. 2006). Ģenētiski līdzīgākā baktēriju suga ir jenotos sastopamā baktērija *Candidatus Neohrlichia lotoris* (Yabsley et al. 2008). Molekulārie pētījumi arī liecina, ka iepriekš Nīderlandē konstatētā baktērija ar nosaukumu *Ehrlichia schotti* ir gandrīz identiska *Ca. N. mikurensis* un būtu uzskatāmas par vienu un to

pašu sugu (Jahfari et al. 2012). Līdzīgi *Ca. N. mikurensis* atbilst baktērija, kas vēl pirms konstatēšanas Japānā bija atklāta Itālijā un pazīstama ar nosaukumu *Ehrlichia walkerii* (Brouqui et al. 2003; Kawahara et al. 2004).

Ca. N. mikurensis ir gramnegatīvi pleomorfiski koki 0,5 – 1,2 μm izmērā (Kawahara et al. 2004). Tie tika konstatēti žurku endotēlija šūnu ieslēgumos un tika uzskatīti par žurku un ērcu parazītiem (Kawahara et al. 2004). Šī šūnās parazitējošā baktērija, kas tika uzskatīta par grūti kultivējamu, pirmo reizi tika izolēta un kultivēta *in vitro* cilvēka šūnās pētījumā, kura rezultāti tika publicēti 2019. gadā (Wass et al. 2019). Šajā pētījumā izdevās inficēt ērcu (*I. ricinus* un *I. scapularis*) šūnu kultūras ar *Ca. N. mikurensis*, kas iegūts no inficētiem cilvēkiem. Erču šūnās tika novērots, ka baktērijas atrodas citoplazmas ieslēgumos tuvu šūnu kodoliem. Pētījumā izdevās inficēt cilvēka vaskulārā endotēlija šūnas – gan no ādas kapilāriem, gan plaušu artērijas. Šūnu līnijas varēja uzturēt līdz, ilgākais, četrām nedēļām, kad iekššūnas parazīta izraisīto bojājumu dēļ šūnas gāja bojā (Wass et al. 2019). Veiksmīgā kultivēšana lika pētījuma autoriem izteikt priekšlikumu, ka *Ca. N. mikurensis* varētu tikt atņemts “Candidatus” statuss (Wass et al. 2019).

Ar *Ca. N. mikurensis* var inficēties gan bezmugurkaulnieki, gan mugurkaulnieki – grauzēji, suņi, cilvēki (Wennerås 2015). Pirmais cilvēka saslimšanas gadījums, ko izraisījusi baktērija *Ca. N. mikurensis*, tika konstatēts 2010. gadā Zviedrijā kādam 77 gadus vecam pacientam ar leukēmiju (Welinder-Olsson 2010). Saslimšana sākotnēji tika novērota cilvēkiem ar novājinātu imūnsistēmu, un kopumā aprakstīts neliels skaits gadījumu. Visi reģistrētie pacienti piedzīvojuši paaugstinātu temperatūru, liela daļa – muskuļu un/vai locītavu sāpes, kā arī vaskulāras un tromboemboliskas problēmas (Grankvist et al. 2014). Bieži sastopamās vaskulārās problēmas, domājams, saistītas ar šūnu kultūrās konstatēto faktu, ka *Ca. N. mikurensis* inficē endotēlija šūnas. Inficēšanos nevar konstatēt ar tipiskiem mikrobioloģiskiem asiņu kultūras testiem, un saslimšanas gadījumi mēdz tikt nepareizi izskaidroti kā pacienta pamatslimību saasinājumi (Wass et al. 2019). Efektīva terapija saslimšanas gadījumā bijis antibiotiku doksiciklīna kurss (Grankvist et al. 2014). Sākot pētīt cilvēku inficēšanās gadījumus, arī tika uzskatīts, ka *Ca. N. mikurensis* ir oportūniska baktērija, kas var izraisīt saslimšanu cilvēkiem ar konkrētām hematoloģiskām vai autoimūnām slimībām, taču vēlāk apstiprinājās, ka inficēšanas var notikt arī šķietami veselu cilvēku organismos (Wass et al. 2019).

Pētījumi norāda, ka grauzēji varētu būt būtisks *Ca. N. mikurensis* rezervuārs un ka šo patogēnu Eiropā izplata galvenokārt *I. ricinus* ērces (Jahfari et al. 2012). Atšķirībā no vairākiem citiem ērcu pārnēsātiem patogēniem, sākotnējie pētījumi liecināja, ka nenotiek tā pārmantošana, inficētai ērcei izdējot olas (Burri et al. 2014). Visticamāk, ērces šo patogēnu

iegūst, barojoties no saimniekorganismiem. Taču līdz tam izdarītos pieņēmumus par transovariālo pārnesi liek apšaubīt Austrijā atrastie ērcu kāpuri ar infekciju (Derdáková et al. 2014). Informācija par to, kurā ērces dzīves ciklā ir lielāka varbūtība, ka tā būs inficēta, ir pretrunīga – ir pētījumi, kuros secināts, ka vairāk ir inficētu pieaugušo īpatņu, savukārt citos pētījumos iegūtie dati likuši izdarīt pretējus secinājumus, kā arī ir pētījumi, kuros nav novērota izteikta atšķirība nimfas un pieauguša īpatņa stadijās (Richter and Matuschka 2011, Silaghi et al. 2012, Andersson et al. 2013). Nīderlandē veiktajos pētījumos atklāta ērcu patogēnu koinfekcija *Ca. N. mikurensis* un *Borrelia afzelii*, kas varētu liecināt par kopīgu baktēriju rezervuāru starp ērcu saimniekorganismiem (Coipan et al. 2013). Savukārt, Centrāleiropā (pētījumā, kas izstrādāts Austrijā, Čehijā un Slovākijā) konstatēts, ka populācijā, palielinoties ērcu, kas inficētas ar *A. phagocytophilum*, proporcijai, pieaug varbūtība, ka ērces būs inficētas ar *Ca. N. mikurensis* (Derdáková et al. 2014).

Ca. N. mikurensis ir konstatēta daudzās Āzijas un Eiropas valstīs; 2015. gadā publicētā apkopojumā norādīts, ka patogēns ir konstatēts Japānā, Ķīnā, Mongolijā, Krievijā, Skandināvijas valstīs, Polijā, Čehijā, Slovākijā, Ungārijā, Rumānijā, Moldovā, Austrijā, Vācijā, Šveicē, Itālijā, Spānijā, Francijā, Nīderlandē un Beļģijā, bet tā izplatība nebija konstatēta Lielbritānijā, ASV un Austrālijā (Wennerås 2015). Eiropā līdz 2014. Gadam visaugstākais *Ca. N. mikurensis* īpatsvars ērcēs tika konstatēts Austrijā (23,5 %) un Vācijā (24,2 – 26,6 %) (Derdáková et al. 2014). Ungārijā pētījumā, kas veikts ar migrējošo putnu ērcēm 2013. gadā, *Ca. N. mikurensis* netika konstatēta, neskatoties uz to, ka šī baktērija Ungārijā ir bijusi konstatēta ērcēs, kas ievāktas ar citām metodēm (Hornok et al. 2014). Norvēģijas dienvidos 2008. gadā ievāktajās putnu ērcēs *Ca. N. mikurensis* prevalence bija 1,2 % (Pedersen et al. 2020), bet Dānijā 2016. gadā ievāktajās putnu ērcēs šī patogēna prevalence bija 1,7 % (Klitgaard et al. 2019). Zviedrijā *Ca. N. mikurensis* īpatsvars ērcēs no migrējošiem putniem bijis 4,2 % un visas ērces, kurās šis patogēns tika identificēts, bija nimfas stadijā (Labbé Sandelin et al. 2015). 2009. gadā veiktā putnu ērcu pētījumā Kaļiņingradas apgabalā konstatēta tikai viena ar *Ca. N. mikurensis* inficēta ērce, līdz ar to patogēna prevalence bija 0,7 % (Movila et al. 2012). Latvijas teritorijā 2017. - 2019. gadā biotopos ievāktajām *I. ricinus*, *I. persulcatus* un *D. reticulatus* ērcēm ir tikusi analizēta *Ca. N. mikurensis* klātbūtne materiālā un noteikts, ka baktērijas īpatsvars ir 5,9 % (*nepublicēti dati*).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

Šajā nodaļā apskatīts pētāmais materiāls, izmantotā aparatūra, reaģenti un praimeri, kā arī aprakstītas metodes un to darbības principi. Šajā darbā ir apkopoti un analizēti dati, kas iegūti vairāku pētnieku darba rezultātā. Ērces no putniem ievāca un putnu informāciju reģistrēja Dr. biol. Oskars Keišs, DNS izdalīšanu, PCR un qPCR testus patogēnu noteikšanai veica vairākas pētnieces Dr. biol. Renātes Rankas grupā Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā. Šī darba autore no datu ievākšanas darbiem ir veikusi ērcu sugas noteikšanu ar qPCR metodi, *Rickettsia spp.* noteikšanu ar divpakāpju PCR un sagatvošanu sekvenēšanai, *Ca. N. mikurensis* detektēšanu ar qPCR un visu iegūtu datu apkopošanu un analīzi.

2.1. Izmantotā aparatūra

1. tabula

Izmantotā aparatūra

Table 1

Hardware used

Iekārta	Modelis	Firma	Valsts
Centrifūga	Force 7	Techne Cambridge	Lielbritānija
Mikrocentrifūga - vortekss	MICROSPIN, FV – 2400	BIOSAN	Latvija
DNA/RNA UV - CLEANER	UVC/T-M-AR	BIOSAN	Latvija
qPCR termocikleris	ViiA™ 7 Real-Time PCR System	AB – Applied Biosystems	ASV
PCR termocikleris	Eppendorf Mastercycler EP Gradient S	Eppendorf	Austrija
Elektroniskie svāri	TE412	Stratorius	Vācija
Mikroviļņu krāsns	NN-E 205W	Panasonic Corporation	Japāna
Līdzstrāvas avots	Electrophoresis Power supply – EPS 3500	Pharmacie Biotech	Lielbritānija
UV gaismas transiluminators ar objektīvu	C-80, Epi-Illumination UV Darkroom	UVP (Ultraviolet Products)	Lielbritānija
Sekvenēšanas sistēma	ABI Prism 3130xl Genetic Analyser	AB – Applied Biosystems	ASV

2.2. Izmantotie reaģenti un praimeri

Reaģenti:

- Fast SYBR™ Green Master Mix, Applied biosystems, Lietuva.
- TaqMan Master Mix, Applied biosystems, Lietuva.
- 5 U/μ FIREPol DNA Polymerase, Solis BioDayne, Igaunija.
- 10x Taq buferis ar (NH₄)₂SO₄, Thermo Scientific, Lietuva.
- 10x Reaction buffer BD, Solis BioDayne, Igaunija.
- 25 mM MgCl₂ Thermo Scientific, Lietuva.
- 10 mM dNTP mix, Thermo Scientific, Lietuva.
- Exo 1 (*Exonuclease I*), Thermo Scientific, Lietuva.
- Fast AP (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*) 1 U/μl, Thermo Scientific, Lietuva.
- Sephadex® G-50 (*superfine*), GE Healthcare Bio-Sciences AB, Zviedrija.
- Big Dye Terminator Cycle sequencing reaction kit (BigDye + 5x Seq. buferis), Nimagen, Nīderlande.
- Hi-Di formamīds, Applied Biosystems, Lietuva.
- 50x TAE buferis, Invirogen, ASV.
- Garuma marķieris GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, ASV.
- 6x Loading Dye, Thermo Scientific, Lietuva.
- Etīdija bromīds.
- Agarozē (TopVision Agarozē), Thermo Scientific, ASV.
- Izmantotie praimeri un zondes apkopotā 2. tabulā, ražotājs: Metabion international AG, Vācija.

2. tabula

Ērces sugas un patogēnu ģints/sugas noteikšanai izmantotie praimeri un zondes. *F*-tiešais praimeris, *R*- reversais praimeris, *P* - zonde

Table 2

Primers and probes used for detection of tick species and pathogen genus/species.

F-forward primer, *R*- reverse primer, *P* - probe

Nosaukums	Gēns	Sekvence	Avots
F: Ix_ri_ITS2_F	ITS2	5' – CGA AAC TCG ATG GAG ACC TG – 3'	Sprong et al. 2019
R: Ix_ri_ITS2_R		5' – ATC TCC AAC GCA CCG ACG T – 3'	
P: Ix_ri_ITS2_P		5' – TTG TGG AAA TCC CGT CGC ACG TTG AAC – 3'	
F: Ix_pe_ITS2_F		5' – TGC GTT GCG TCT TCT CTT GTT – 3'	

R: Ix_pe_ITS2_R		5' – TCG ATA AAA CCA GGT AGG AGG A – 3'	
P: Ix_pe_ITS2_P		5' – TTT CGG AGC AAG TAC AGA GGG AGC AAA – 3'	
F: Neo2f	<i>groEL</i>	5' – GCA AAT GGA GAT AAA AAC ATA GGT AG – 3'	Jenkins et al. 2019
R: Neo2r		5' – CAT ACC GTC AGT TTT TTC AAC TTC TAA – 3'	
F: 5-22F	<i>18S rRNS</i>	5' – GTT GAT CCT GCC AGT AGT – 3'	Birkenheuer et al. 2003
R: 1661R		5' – AAC CTT GTT ACG ACT TCT C – 3'	
F: 455-479F		5' – GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG TGA C – 3'	
R:793-772R		5' – ATG CCC CCA ACC GTT CCT ATT A – 3'	
F: ge3a	<i>16S rRNS</i>	5' – CAC ATG CAA GTC GAA CGG ATT ATT C – 3'	Massung et al. 1998
R: ge10r		5' – TTC CGT AAG AAG GAT CTA ATC TCC – 3'	
F: ge9f		5' – AAC GGA TTA TTC TTT ATA GCT TGC T – 3'	
R:ge2		5' – GGC AGT ATT AAA AGC AGC TCC AGG – 3'	
F: VC29	<i>gltA</i>	5' – GCG GAA GCC GAT TGC TTT AC – 3'	Namina et al. 2019
F: RH314		5' – AAA CAG GTT GCT CAT CAT TC – 3'	Nilsson et al. 1999
R: CS1069		5' – CAG GGT CTT CGT GCA TTT CTT – 3'	Mcintosh et al. 2015
F:16S1A	<i>16S rRNS</i>	5' – CTA ACG CTG GCA GTG CGT CTT AAG C – 3'	Richter D, Matuschka FR. 2006
F: 16S2A		5' – AGT CAA ACG GGA TGT AGC AAT ACA – 3'	
R: 16S1B		5' – AGC GTC AGT CTT GAC CCA GAA GTT C – 3'	
R:16S2B		5' – GGT ATT CTT TCT GAT ATC AAC AG – 3'	

2.3. Pētāmais materiāls un DNS izdalīšana

Darbā analizētās ērces tika nolasītas no putniem Papes dabas parkā putnu gredzenošanas laikā no 2018. gada augusta līdz oktobrim. Nolasītās ērces bija nimfas un kāpura stadijās, un daudziem putniem bija vairākas ērces. DNS tika izdalīta atsevišķi no katras ērcu nimfas, bet kāpura attīstības stadijas gadījumā no viena putna ņemtie paraugi tika apvienoti un ekstrahēti kopā, lai iegūtu materiālu ar pietiekami lielu DNS koncentrāciju. Kāpuru gadījumā minimālais skaits, kas izdalīts kā viens paraugs, bija viens kāpurs, bet maksimālais skaits –

13. Vidēji kā viens paraugs tika analizēti 3,7 kāpuri. Izmantoto DNS paraugu un ērcu attīstības stadiju apkopojums redzams 3. tabulā.

DNS izdalīšana tika veikta ar fenola/hloroforma metodi (Capligina et al. 2020). Vispirms katra nimfa vai kāpurs(-i) tika homogenizēti 300 µl sterila ūdens, tad DNS ekstrahēšanai uz 100 µl ērcu suspensijas tika ņemts 50 µl šķeļošs buferis [30 mM Tris-HCl (pH 8.0), 75 mM EDTA (pH 8.0), 0.3 M NaCl, 1.5% SDS] un 2.5 µl proteināze K (20 mg/ml). Paraugi tika inkubēti 50°C 1 stundu, lai pēc tam izdalītu DNS ar fenola/hloroforma metodi. Izdalītie DNS paraugi ar koncentrācijām robežās no 0,6 līdz 329,9 ng/µl uzglabāti saldētavā -20°C temperatūrā līdz turpmākai izmantošanai.

3. tabula

Izmantotie DNS paraugi.

Table 3

DNA samples used.

Ērces attīstības stadija	Paraugu skaits (%)
Nimfa	628 (79,6 %)
Kāpurs (apvienotie paraugi)	160 (20,4 %)
Izmantotie paraugi kopā:	788

2.4. Reālā laika PCR

2.4.1. Ērcu sugu identificēšana

Ērcu suga tika noteikta ne tikai, lai iegūtu vairāk informācijas par paraugkopu un apstiprinātu morfoloģisko slēdzienu, bet arī lai izslēgtu viltus negatīvus rezultātus attiecībā uz ērcēs sastopamajiem patogēniem, izmantojot sugu par iekšējo kvalitātes kontroli. Kopumā tika testēti 1055 ērcu paraugi (nimfas un ērcu kāpuru apvienotie paraugi), taču tikai 788 (74,7%) tika apstiprināta suga un veiktas turpmākās analīzes. Šis solis apstiprina, ka izmantotā DNS ir pietiekami kvalitatīva (DNS koncentrācijas un tīrības mērījumi nav pietiekami definitīvi) un ka atbilstošā daudzumā ir izdalīta tieši ērcu DNS nevis, piemēram, DNS no ērces uzņemtajām putnu asinīm.

Ērcu sugas molekulārai noteikšanai tika izmantota reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija (qPCR), veicot multipleksu pārbaudi ar TaqMan zondēm uz divām Latvijā izplatītākajām ērcu sugām *Ixodes ricinus* (FAM fluorofors) un *Ixodes persulcatus* (HEX fluorofors), izmantojot 4. tabulā uzskaitītos reaģentus. Reakcijas apstākļi definēti 5. tabulā, fluorescences nolasījums veikts katra amplifikācijas cikla beigās.

Reakcijas maisījums vienam paraugam *I. ricinus* un *I. persulcatus* noteikšanai ar qPCR.

Table 4

Reaction mix for identification of *I. ricinus* and *I. persulcatus* with qPCR for one sample.

Sastāvdaļas	Gala koncentrācija	Tilpums, µl
Ūdens bez nukleāzes	-	2,68
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2x)	1x	5,5
10 µM Ix_ri ITS2_F praimeris	0,15 µM	0,17
10 µM Ix_ri ITS2_R praimeris	0,15 µM	0,17
10 µM Ix_pe ITS2_F praimeris	0,15 µM	0,17
10 µM Ix_pe ITS2_R praimeris	0,15 µM	0,17
10 µM Ix_pe ITS2_P zonde (HEX)	0,1 µM	0,11
10 µM Ix_ri ITS2_P zonde (FAM)	0,05 µM	0,06
PCR maisījuma tilpums uz 1 paraugu		9,005
Parauga DNS ($\geq 1,2$ ng)		2-4

qPCR reakcijas apstākļi *Ixodes* sugas noteikšanai.

Table 5

qPCR reaction conditions for determining *Ixodes* species.

T, °C	Laiks	Ciklu skaits
50	2 min	1
95	20 s	1
95	3 s	40
65	30 s	

2.4.2. *Ca. N. mikurensis* identificēšana ar qPCR

Ca. N. mikurensis noteikšanai qPCR maisījums tika sagatavots atbilstoši 7. tabulā minētajām proporcijām (izņemot DNS) un safasēts baltos qPCR stripos pa 16 µl katrā. Sterilā DNS boksā reakcijas maisījumam katrā stobriņā tika pievienota 4 µl parauga DNS. Katrā testēšanas reizē tika izmantota negatīvā kontrole ar destilētu ūdeni DNS vietā.

Reakcijas apstākļi ir aprakstīti 8. tabulā. Pēc reakcijas amplifikācijas fāzes tika veikta disociācijas analīze, pakāpeniski paaugstinot temperatūru no 60°C līdz 95°C ar 0,5°C pieaugumu ciklā. Šādi, papildus novērotajai amplifikācijai, tiek apstiprināts, vai novērota pētāmā DNS fragmenta amplifikācija. Kušanas temperatūras līknes pīķim *Ca. N. mikurensis* amplikonu gadījumā jābūt robežās no 71,7°C līdz 75°C (Jenkins et al. 2019). Visiem pozitīvajiem paraugiem tika veikta atkārtota qPCR, lai izslēgtu kontaminācijas varbūtību.

Reakcijas maisījums vienam paraugam *Ca. N. mikurensis* noteikšanai ar qPCR.

Table 7

Reaction mix for detection of *Ca. N. mikurensis* with qPCR for one sample.

Sastāvdaļas	Koncentrācija	Tilpums, µl
1x SYBR Green Master mix	1x	11,0
Ūdens bez nukleāzes	-	4,8
Neo2f (100 nM)	0,5 nM	0,1
Neo2r (100 nM)	0,5 nM	0,1
PCR maisījuma tilpums uz 1 paraugu		16,0
Parauga DNS	<i>Sākot no 2,4 ng uz reakciju</i>	4

8. tabula

qPCR reakcijas apstākļi *Ca. N. mikurensis* noteikšanai.

Table 8

qPCR reaction conditions for detection of *Ca. N. mikurensis*.

T, °C	Laiks	Ciklu skaits
50	2 min	1x
95	10 min	1x
95	15 s	40x
60	1 min	
95	15 s	1x
60	1 min	1 x
60-95	0,5°C/s	

2.5. Divpakāpju PCR ērcu patogēnu identifikācijai

Atlikušo pētīto patogēnu (*Rickettsia sp.*, *Babesia sp.*, *Anaplasma phagocytophilum*) identificēšanā tika izmantota divpakāpju PCR (*nested PCR*) metode. Šajā metodē tiek veiktas divas PCR reakcijas ar dažādiem praimeriem, kur otrajā reakcijā tiek amplificēti fragmenti no pirmās reakcijas produktiem - otrās reakcijas praimerī piesaistās sekvencēm iekšpus pirmās reakcijas mērķa amplikoniem. Šo metodi izmanto gadījumos, kad paraugos ir maz mērķa DNS, vai kad reakcijas apstākļi var veicināt nespecifisku amplificēšanos. Pētījumos pierādīts, ka divpakāpju PCR palielina reakcijas jutīgumu pat līdz 1000 reizēm (van Pelt-Verkuil et al. 2008). Ja paraugā identificēta patogēna klātbūtne, iegūtie amplikoni tālāk sekvencēti, lai apstiprinātu pozitīvo rezultātu un noskaidrotu sugas piederību.

Sekojoši tiks aprakstīti nepieciešamie reaģenti un reakcijas apstākļi ar divpakāpju PCR testētajiem ērcu patogēniem.

2.5.1. *Anaplasma phagocytophilum* identificēšana ar PCR

Patogēna *Anaplasma phagocytophilum* noteikšana tika veikta ar divpakāpju PCR metodi, kuras mērķa gēns bija bakteriālā 16S rRNS. Abu PCR reakciju maisījumi (9. tabula) tika sagatavoti atbilstoši paraugu skaitam un safasēti PCR stripos. Uz katru reakciju pāri tika sagatavota arī pozitīvā un negatīvā kontrole. PCR apstākļi definēti 10. un 11. tabulā.

9. tabula

Reakcijas maisījums vienam paraugam *Anaplasma phagocytophilum* noteikšanai ar PCR.

Table 9

Reaction mix for identification of *Anaplasma phagocytophilum* with PCR for one sample.

Sastāvdaļas	Koncentrācija	Tilpums, μ l
Ūdens bez nukleāzes	-	17,08
10x Reaction buffer BD	1x	2,6
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	2,6
10 mM dNTP mix	200 μ M	0,52
10 μ M <i>forward</i> praimeris 1. reakcijai: ge3a 2. reakcijai: ge9f	0,2 μ M	0,52
10 μ M <i>reverse</i> praimeris 1. reakcijai: ge10r 2. reakcijai: ge2	0,2 μ M	0,52
5 U/ μ FIREPol DNA	0,8 U	0,16
PCR maisījuma tilpums uz 1 paraugu		24,0
Parauga DNS	<i>Sākot no 1,2 ng uz reakciju</i>	2

10. tabula

Pirmās PCR reakcijas apstākļi *Anaplasma phagocytophilum* noteikšanai.

Table 10

First PCR reaction conditions for determining *Anaplasma phagocytophilum*.

T, °C	Laiks	Ciklu skaits
95	3 min	1x
95	20 s	35x
58	20 s	
72	40 s	
72	5 min	1 x

Otrās PCR reakcijas apstākļi *Anaplasma phagocytophilum* noteikšanai.

Table 11

Second PCR reaction conditions for determining *Anaplasma phagocytophilum*.

T, °C	Laiks	Ciklu skaits
95	3 min	1x
95	20 s	35x
58	20 s	
72	30 s	
72	5 min	1 x

2.5.2. *Babesia* spp. identificēšana ar PCR

Babēziju ģints patogēnu detektēšanas reakciju maisījumi un PCR apstākļi aprakstīti 12., 13. un 14. tabulā. Pozitīvo paraugu sugas identificēšana veikta izmantojot Sangera sekvenēšanu.

Reakcijas maisījums vienam paraugam *Babesia* spp. noteikšanai ar PCR.

Table 12

Reaction mix for identification of *Babesia* spp. with PCR for one sample.

Sastāvdaļas	Koncentrācija	Tilpums, µl
Ūdens bez nukleāzes	-	17,08
10x Taq buferis ar (NH ₄) ₂ SO ₄	1x	2,6
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	2,6
10 mM dNTP mix	200 µM	0,52
10 µM <i>forward</i> praimeris 1. reakcijai: 5-22F 2. reakcijai: 1661R	0,2 µM	0,52
10 µM <i>reverse</i> praimeris 1. reakcijai: 455-479F 2. reakcijai: 793-772R	0,2 µM	0,52
5 U/µl Taq DNA Polymerase	0,8 U	0,16
PCR maisījuma tilpums uz 1 paraugu		24,0
Parauga DNS	Sākot no 1,2 ng uz reakciju	2

13. tabula

Pirmās PCR reakcijas apstākļi *Babesia spp.* noteikšanai.

Table 13

First PCR reaction conditions for determining *Babesia spp.*

T, °C	Laiks	Ciklu skaits
95	1 min	1x
95	20 s	35x
55	30 s	
72	60 s	
72	5 min	1 x

14. tabula

Otrās PCR reakcijas apstākļi *Babesia spp.* noteikšanai.

Table 14

Second PCR reaction conditions for determining *Babesia spp.*

T, °C	Laiks	Ciklu skaits
95	1 min	1x
95	20 s	35x
55	30 s	
72	30 s	
72	5 min	1 x

2.5.3. *Borrelia* spp. identificēšana ar PCR

Borēliju ģints patogēnu detektēšanai par mērķa gēnu PCR reakcijās tika izmantots *16S rRNS*. Reakciju maisījumi un PCR apstākļi aprakstīti 15.-17. tabulā.

15. tabula

Reakcijas maisījums vienam paraugam *Borrelia* spp. noteikšanai ar PCR.

Table 15

Reaction mix for identification of *Borrelia* spp. with PCR for one sample.

Sastāvdaļas	Koncentrācija	Tilpums, µl
Ūdens bez nukleāzes	-	17,5
10x Taq buferis ar (NH ₄) ₂ SO ₄	1x	2,6
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	2,6
10 mM dNTP mix	100 µM	0,52
10 µM <i>forward</i> praimeris 1. reakcijai: 16S1A 2. reakcijai: 16S2A	0,2 µM	0,52
10 µM <i>reverse</i> praimeris 1. reakcijai: 16S1B 2. reakcijai: 16S2B	0,2 µM	0,52
5 U/µl Taq DNA Polymerase	0,8 U	0,16
PCR maisījuma tilpums uz 1 paraugu		24,0
Parauga DNS	<i>Sākot no 1,2 ng uz reakciju</i>	2

16. tabula

Pirmās PCR reakcijas apstākļi *Borrelia* spp. noteikšanai.

Table 16

First PCR reaction conditions for determining *Borrelia* spp.

T, °C	Laiks	Ciklu skaits
95	1 min	1x
95	20 s	30x
63	20 s	
72	40 s	
72	5 min	1 x

Otrās PCR reakcijas apstākļi *Borrelia spp.* noteikšanai.

Table 17

Second PCR reaction conditions for determining *Borrelia spp.*

T, °C	Laiks	Ciklu skaits
95	1 min	1x
95	20 s	35x
56	20 s	
72	30 s	
72	5 min	1 x

2.5.4. *Rickettsia spp.* identificēšana ar PCR

Riketsiju noteikšanai ar PCR var tikt amplificēti dažādi gēni (Pesquera et al. 2015), bet šajās reakcijās mērķa gēns bija citrātu sintāzes gēns *gltA*. Reakcijas maisījums un apstākļi aprakstīti 18.-20. tabulā.

Reakcijas maisījums vienam paraugam *Rickettsia spp.* noteikšanai ar PCR.

Table 18

Reaction mix for identification of *Rickettsia spp.* with PCR for one sample.

Sastāvdaļas	Koncentrācija	Tilpums, µl
Ūdens bez nukleāzes	-	17,08
10x Reaction buffer BD	1x	2,6
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	2,6
10 mM dNTP mix	200 µM	0,52
10 µM <i>forward</i> praimeris 1. reakcijai: VC29 2. reakcijai: RH314	0,2 µM	0,52
10 µM <i>reverse</i> praimeris CS1069 (abām reakcijām)	0,2 µM	0,52
5 U/uL FIREPol DNA Polymerase	0,8 U	0,16
PCR maisījuma tilpums uz 1 paraugu		24,0
Parauga DNS	<i>Sākot no 1,2 ng uz reakciju</i>	2

Pirmās PCR reakcijas apstākļi *Rickettsia spp.* noteikšanai.

Table 19

First PCR reaction conditions for determining *Rickettsia spp.*

T, °C	Laiks	Ciklu skaits
95	3 min	1x
95	20 s	35x
55	30 s	
72	50 s	
72	5 min	1 x

Otrās PCR reakcijas apstākļi *Rickettsia spp.* noteikšanai.

Table 20

Second PCR reaction conditions for determining *Rickettsia spp.*

T, °C	Laiks	Ciklu skaits
95	3 min	1x
95	20 s	35x
58	30 s	
72	50 s	
72	5 min	1 x

2.6. PCR produktu vizualizācija agarozes gēlā, izmantojot elektroforēzi

Ar divpakāpju PCR iegūtie produkti tika vizualizēti agarozes gēlā, izmantojot elektroforēzi (1. pielikums). Lai pagatavotu 1,5 % agarozes gēlu, vienvērtīgam TAE buferim tika pievienots agarozes pulveris un maisījums karsēts mikroviļņu krāsnī (600 W) līdz šķīdums kļuva dzidrs. Pēc tam šķidrās agarozes gēls atdzesēts līdz aptuveni 55-60°C temperatūrai un tajā iemaisīti 10 µl etīdija bromīda, kas nodrošina amplikonu redzamību UV gaismā. Gatavo agarozes šķīdumu ielēja iepriekš sagatavotās formās ar ķemmītēm, un tas tika atstāts sacietēt uz aptuveni 20 min pirms ievietošanas ar 1x TAE buferi pildītā vanniņā.

No katra parauga tika ņemti 5 µl otrā PCR produkta un sajaukti ar 2 µl krāsvielas (2x *Loading Dye*). Katrs paraugs ar pipeti tika iepildīts agarozes gēla bedrītē un katras paraugu rindas galā tika pievienoti 5 µl DNS garuma marķiera (*GeneRuler™ 100bp PLUS DNA Ladder*).

Vanniņas ar sagatavoto gēlu tika pieslēgtas līdzstrāvas avotam, kurā tika iestatīti sekojoši parametri: 120V un 75mA. Elektroforēzes ilgums, atkarībā no mērķamplikona garuma, bija 40-60 min. Gēli tika apskatīti UV gaismas iluminātorā un nofotogrāfēti. Pozitīvie paraugi tika atlasīti sekvencēšanai.

2.7. Paraugu sagatavošana Sangerā sekvencēšanai

Paraugi, kuros ar elektroforēzi apstiprināts, ka tie ir pozitīvi uz testētās ģints (*Borrelia sp.*, *Babesia sp.*, *Rickettsia sp.*) patogēnu, tika sagatavoti sekvencēšanai. Vispirms sagatavo reaģentu maisījumu otrās PCR reakcijas produktu attīrīšanai, atbilstoši paraugu skaitam (21. tabula). Kad katram paraugam pievienots enzīmu maisījums blakusproduktu šķelšanai, tos uzvorteksē un ievieto PCR aparātā, inkubē 37°C - 20 min, pēc tam 95°C - 15 min. Pēc reakcijas paraugus uzglabā saldētavā turpmākai apstrādei vai uzreiz izmanto sekvencēšanas reakcijai (22., 23. tabula).

21. tabula

Enzīmu maisījums vienam paraugam.

Table 21

Enzyme mix for one sample.

Reaģents	Tilpums, µl
Exo 1 (<i>Exonuclease I</i>)	0,25
Fast AP (<i>Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i>)	1
Kopā:	1,25

Pirms sekvencēšanas reakcijas sagatavo sefadeksa plati, kas tiks lietota paraugu attīrīšanai un izgulsnēšanai. Sefadeksa pulveri (*Sephadex® G-50 (superfine)*) uzber uz metāla trafareta plates ar bedrītēm, ar stikliņu izlīdzina to tā, lai vienādi līdz malām tiktu aizpildītas visas bedrītes. Uz trafareta precīzi uzliek Millipore puscaurspīdīgo plati un apgriež otrādi, lai pārnestu tajā sefadeksa pulveri. Katrā Millipore plates bedrītē ar sefadeksa pulveri ienes 300 µl dejonizēta ūdens uzbriedināšanai. Līdzīgi sagatavo arī atsvara plati, kas nepieciešama centrifugācijai. Sapildīto plati ievieto ledusskapī 4°C temperatūrā un atstāj uzbriest uz vismaz 2-3 stundām vai nakti.

Sagatavo maisījumu sekvencēšanas reakcijai (22. tabula). Maisījumu iepilda platē, kas atrodas uz ledus statīva, un pievieno 5 µl PCR produkta, kas apstrādats ar enzīmu maisījumu. Platei uzlīmē alumīnija folliju, sajauc uz kratītāja, nocentrifugē un liek PCR aparātā pēc 23. tabulā aprakstītajiem parametriem. Ja pēc reakcijas paraugi netiek attīrīti uzreiz, plati ievieto saldētavā -20°C temperatūrā.

Sekvencēšanas reakcijas maisījums vienam paraugam.

Table 22

Sequencing reaction mix for one sample.

Reāģents	Tilpums, μl
Udens bez nukleāzes	2,0
5x Seq buferis	2,0
Big Dye	0,5
RH314 praimeris	0,5
Kopā	5,0

Sekvencēšanas PCR reakcijas apstākļi.

Table 23

PCR reaction conditions for sequencing.

T, $^{\circ}\text{C}$	Laiks	Ciklu skaits
95	5 min	1x
96	15 s	35x
50	5 s	
60	4 min	
4	∞	-

Visbeidzot tika veikta sekvencēto paraugu attīrīšana iepriekš uzbriedinātājā sefadesa platē. Uzbriedināto sefadesu izņem no ledusskapja un centrifugē 10 min ar ātrumu 1500 apgrīzieni minūtē, izmantojot arī atsvaram paredzēto plati. No apakšējās plates izlej lieko ūdeni un no jauna katrā bedrītē iepilda 150 μl destilēta ūdens. Centrifugē 8 min ar ātrumu 2000 apgrīzieni minūtē un no apakšējās plates izlej lieko ūdeni. Ja DNS paraugi pēc sekvencēšanas reakcijas ir bijuši sasaldēti, tos atkausē un nocentrifugē. Ar daudzkanālu pipeti ienes 10 μl paraugu sefadesa centrā. Apakšējo plati nomaina uz sterilu MicroAmp plati un centrifugē 8 minūtes ar ātrumu 2500 apgrīzieni minūtē. Apakšējo MicroAmp plati 1,5 stundas žāvē termociklerī 70 $^{\circ}\text{C}$ temperatūrā. Pie izžuvušajiem paraugiem katrā bedrītē iepilda 11 μl Hi-Di formamīda, uzlīmē alumīnija folliju, uzvorteksē, nocentrifugē un liek karsēties termociklerī 95 $^{\circ}\text{C}$ temperatūrā uz 6 minūtēm. Plati izņem, pirms tā ir atdzisusi līdz 4 $^{\circ}\text{C}$, strauji dzesē uz ledu un uz 20 minūtēm ievieto saldētavā -20 $^{\circ}\text{C}$ temperatūrā. Paraugus nosūta sekvencēšanai pēc Sangera metodes uz Latvijas Genoma centru.

2.8. Datu apstrāde un statistika

Agarozes gēlu apskatīšanai un rezultātu piefiksēšanai tika izmantots UV gaismas transiluminators ar gelu fotogrāfēšanas sistēmu C-80 Epi-Illumination UV Darkroom ar attēlu apstrādes programmu Irfanview.

Reālā laika PCR rezultātu nolasīšanai tika izmantota programma “Quant studio™”, kurā apskatāmi vizualizēti rezultāti – amplifikācijas un kušanas līknes. Nolasot amplifikācijas rezultātu, vizualizācijai tika izvēlēts ΔRn vs $Cycle$ līknes veids, kurā redzama līkne, ko veido normalizēti fluorescences signāla dati pēc katra amplifikācijas cikla. Fluorescence normalizēta, jo reaģenti iekļauj pasīvo referenci ar ROX fluoroforu. Amplifikācijas sliekšnis (*threshold*) nepieciešamības gadījumā tika koriģēts manuāli, lai uzlabotu rezultātu interpretāciju. Dati tika eksportēti *Excel* (.xls) formātā, saglabājot informāciju par to, kurā ciklā notika amplifikācija un kādas bija DNS kušanas temperatūras.

Datu apstrādei tika izmantotas programmas *Excel* un *Rstudio* (R Core Team 2020) un tās pakete *Hmisc* (Harrell et al. 2021), no kuras pielietots divpusējais eksaktais binomiālais tests (*binomial test*). Datu apstrādei izmantots arī tiešsaistes programmatūras GraphPad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>) divpusējais eksaktais Fišera tests (*Fisher's exact test*).

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Kopā veikta nolasīto ērcu analīze no 369 putniem, kas iekļāva 788 DNS paraugus (nimfas un apvienoto kāpuru paraugus). Kopumā gredzenošanas laikā identificētas 40 putnu sugas, bet divas no tām izslēgtas, jo no tām nolasītās ērces neizturēja kvalitātes kontroli. No sekojoši ietvertajām 38 sugām izplatītākās 13 veidoja 87,5 % no kopējā putnu daudzuma un no tām nolasītās ērces sasniedza 90,7 % no visām analizētajām ērcēm (24. un 25. tabula).

3.1. Putnu pārnēsātās ērces un to patogēni

Putnu sugas ar vislielāko ērcu skaitu (24. tabula) atbilst citos pētījumos konstatētajam, ka visvairāk ērcu piesūcas *Turdus* ģints putniem (šeit – melnais mežastrazds *Turdus merula* un dziedātājstrazds *Turdus philomelos*), kuriem barošanās apstākļu dēļ ir lielāka iespējamība kļūt par ērcu saimniekorganismiem (Hasle et al. 2011). Tāpat arī sarkanrīklīte (*Erithacus rubecula*), kas šajā pētījumā ir visplašāk pārstāvētā suga, arī citos pētījumos minēta kā putnu suga ar lielu ērcu skaitu (Marsot et al. 2012; Movila et al. 2013; Biernat et al. 2016; Klitgaard et al. 2019). *Acrocephalus* ģints putni – purva ļauķis (*Acrocephalus palustris*) un ezera ļauķis (*Acrocephalus scirpaceus*) arī ir lielu ērcu skaitu. Informācija par putnu sugām ar lielāku inficētu ērcu prevalenci var būt par pamatu turpmākiem pētījumiem par atsevišķu patogēnu rezervuāriem.

24. tabula

Izplatītākās putnu sugas, no kurām tika nolasītas ērces.

Table 24

The most prevalent bird species from which ticks were collected from.

13 izplatītākās sugas	Putnu skaits	Putnu skaits % no visiem putniem
Sarkanrīklīte	112	30,4
Melnais mežastrazds	43	11,7
Purva ļauķis	28	7,6
Ezera ļauķis	22	6,0
Dziedātājstrazds	21	5,7
Lielā zilīte	17	4,6
Pelēkā zilīte	17	4,6
Mizložņa	13	3,5
Žubīte	13	3,5
Peļkājīte	12	3,3
Erickiņš	10	2,7
Zeltgalvītis	8	2,2
Vītītis	7	1,9
KOPĀ		87,5

Pētījumā apskatīto 13 izplatītāko putnu sugu pārnēsātie patogēni un to īpatsvars no kopējiem rezultātiem. K- kāpuri; N - nimfas.

Table 25

Pathogens transmitted by the 13 most common bird species in this study and their share of the total results. K - larvae; N -nymphs.

Putna suga	Putnu skaits	Ērču skaits			Cik ērču bija inficēts atkarībā no putna sugas (%)				
		N	K (apvien.) *	Kopā	<i>Borrelia sp.</i>	<i>A. phagocyto philum</i>	<i>Babesia sp.</i>	<i>Rickettsia sp.</i>	<i>C. N. micurensis</i>
Sarkanrīklīte	112	103	79 (385)	182	12 (6,6 %)	2 (1,1 %)	2 (1,1 %)	19 (10,4 %)	7 (3,8 %)
Melnais mežastrazds	43	188	15 (41)	203	22 (10,8%)	3 (1,5 %)	0	35 (17,2 %)	9 (4,4 %)
Purva ļauķis	28	50	11 (27)	61	2 (3,3 %)	0	0	3 (4,9 %)	1 (1,6 %)
Ezera ļauķis	22	26	5 (6)	31	0	1 (3,2 %)	0	1 (3,2 %)	0
Dziedātājstrazds	21	54	9 (37)	63	7 (11,1 %)	0	2 (3,2 %)	10 (15,9 %)	5 (7,9 %)
Lielā zilīte	17	22	3 (7)	25	2 (8,0 %)	0	0	4 (16,0 %)	0
Pelēkā zilīte	17	22	4 (10)	26	0	0	0	2 (7,7 %)	4 (15,4 %)
Mizložņa	13	27	3 (13)	30	2 (6,7 %)	0	0	9 (30,0 %)	1 (3,3 %)
Žubīte	13	23	5 (9)	28	4 (14,3 %)	0	1 (3,6 %)	3 (10,7 %)	1 (3,6 %)
Peļķājīte	12	28	6 (23)	34	3 (8,8 %)	0	0	1 (2,9 %)	0
Erickiņš	10	12	3 (10)	15	0	0	0	1 (6,7 %)	2 (13,3 %)
Zeltgalvītis	8	9	0	9	1 (11,1 %)	0	0	1 (11,1 %)	1 (11,1 %)
Vītītis	7	7	1	8	2 (25,0 %)	0	0	0	0
KOPĀ, n	323	571	144	715	57	6	5	89	31
%**	87,5	90,9	90,0	90,7	91,9	100,0	100,0	97,8	96,9

* Aprēķinos pieņemts, ka apvienotajā paraugā tikai viens kāpurs ir pozitīvs.

** No visiem analizētajiem paraugiem

Tā kā šeit pētītie putni migrē uz ziemošanas vietām, tie pārvieto arī parazitējošo ērču patogēnus uz citiem areāliem. Tādējādi šajā pētījumā iegūtā informācija par patogēniem sniedz priekšstatu par to, kā veidojas patogēnu sugu sastāvs putnu ziemošanas vietās. Taču

informācija, ko negūstam no šī pētījuma, ir ar kādiem patogēniem migrējošie putni atgriežas Latvijā no ziemošanas vietām. Putnu ērcu pētījumā Norvēģijas dienvidos, kur atsevišķi tika analizēti dati no pavasara un rudens migrācijām, konstatēta lielāka patogēnu prevalence pavasarī ievāktajos paraugos (Pedersen et al. 2019). Skaidrāku priekšstatu par kopsakarībām un putnu migrācijas ietekmi varētu gūt, plašākā pētījumā apvienojot gan precīzus putnu migrāciju datus, gan ērcu un to patogēnu prevalenci putnu galamērķos.

3.2. *Borrelia spp.* prevalence

Analizētajās putnu ērcēs *Borrelia spp.* bija otrs biežāk sastopamais patogēns, taču ar vislielāko sugu daudzveidību. Analizējot 788 putnu ērcu DNS paraugus, tika konstatēti 62 pozitīvi *Borrelia spp.* gadījumi jeb 7,87 % (CI 95%: 6,08 % - 9,97 %). Kopumā tika identificētas četras borēliju sugas: *Bo. afzelii*, *Bo. spielmanii*, *Bo. garinii* un *Bo. miyamotoi* (26. tabula). Vairākām putnu sugām uz viena īpatņa tika konstatēta vairāk nekā viena inficēta ērce, tajā skaitā arī koinfekcijas ar dažādām borēliju sugām (26. tabula, 2.pielikums).

26. tabula

Borēliju sugas un putnu sugas, no kurām inficētās ērces ir nolasītas.

Table 26

Borrelia species and bird species which the infected ticks were collected from.

Putna suga	Putnu skaits		Ērcu skaits ar patogēnu			
	Kopā (% no šīs sugas putniem*)	T. sk. ar >1 inficētu ērci	<i>Bo. afzelii</i>	<i>Bo. spielmanii</i>	<i>Bo. garinii</i>	<i>Bo. miyamotoi</i>
Melnais mežastrazds	13 (30,2 %)	7	4	12	7	-
Sarkanrīklīte	12 (10,7 %)	-	7	2	3	-
Dziedātājstrazds	5 (23,8 %)	2	5	-	2	-
Žubīte	4 (30,8 %)	-	3	-	1	-
Lielā zīlīte	3 (17,6 %)	-	2	-	1	-
Peļkājīte	3 (25 %)	-	3	-	-	-
Brūnspārnu ļauķis	3	-	2	1	-	-
Mizložņa	2 (15,4 %)	-	1	1	-	-
Vītītis	2	-	2	-	-	-
Purva ļauķis	2 (7,1 %)	-	-	-	-	2
Zeltgalvītis	1	-	1	-	-	-
Čuncīņš	1	-	-	1	-	-
Kopā	51	9	30	17	14	2

*Procenti iekavās norādīti vien tad, ja kopumā pētījumā ir bijis 10 vai vairāk šīs sugas putnu.

Taču kopumā borēliju prevalence ir statistiski būtiski mazāka ($p < 0,005$) nekā 2009. gada putnu ērcu pētījumā Latvijā (18%, $n=93$), kā arī statistiski būtiski mazāka ($p < 0,0001$) nekā *I. ricinus* ērcēs 2017.-2019. gadā (15,99%). Jāatzīmē, ka 2009. gada putnu ērcu pētījumā neuzrādījās plašākajā biotopu pētījumā sastopamākais *Bo. afzelii* (15,19 %, $n=3840$), bet 2018. gada putnu ērcēs šī suga bija visizplatītākā no *Borrelia* ģints, sastādot 48,39 % no pozitīvajiem gadījumiem, un ar kopīgo prevalenci 3,8 % (CI 95 %: 2,58% - 5,39 %) (27. tabula).

Tā kā putnu ērces tika ievāktas gadā, kas tika iekļauts biotopu ērcu pētījumā (2017.-2019. gads), ir likumsakarīgi, ka abos pētījumos ir viena un tā pati izplatītākā borēliju suga (Capligina 2020). Savukārt 2009. gada putnu ērcēs visizplatītākā borēliju suga, *Bo. valaisana*, kas, skaitot arī koinfekcijas, bija ar prevalenci 11,8 %, 2018. gada putnu ērcēs nebija sastopama vispār, un arī Latvijas biotopu ērcu pētījumā nepilnus desmit gadus vēlāk bija salīdzinoši reti sastopama suga (1,22 %). Var secināt, ka laika posmā starp iepriekšējo putnu ērcu pētījumu un šo pētījumu ir notikušas izmaiņas atsevišķu sugu prevalencē, un nav izslēgts, ka tās liecina par konkurējošām attiecībām starp borēliju ģints patogēniem.

27. tabula

Borēliju sugu prevalence un inficēto ērcu attīstības stadija.

Table 27

Borrelia species prevalence and the developmental stage of the infected ticks.

Patogēna suga	Inficēto ērcu skaits	% no pozitīvajiem	Prevalence	Kāpuri	Nimfas	Kāpuru īpatsvars
<i>B.afzelii</i>	30	48.39%	3.80%	7	23	23.33%
<i>B.spielmanii</i>	17	27.42%	2.15%	4	13	23.53%
<i>B.garinii</i>	14	22.58%	1.77%	2	12	14.29%
<i>B.miyamotoi</i>	2	3.23%	0.25%	1	1	50.00%
Kopā*	62		7.86%	14	48	22.58%
*ir 1 nimfa ar <i>B.garinii</i> + <i>B.spielmanii</i> koinfekciju						

Salīdzinot *Borrelia* ģints sugu skaitu 2009. un 2018. gada putnu ērcēs, jāatzīmē, ka ir samazinājusies prevalence, bet pieaugusi daudzveidība. Ja 2009. gadā bija tikai divas sugas ar līdzīgu prevalenci – *Bo. valaisana* un *Bo. garinii* – tad 2018. gadā bija sastopamas jau četras sugas: *Bo. afzelii*, *Bo. spielmanii*, *Bo. garinii* un *Bo. miyamotoi*. Vienīgā suga, kas bija sastopama gan 2009., gan 2018. gadā, bija *Bo. garinii*, kas 2009. gadā sastādīja aptuveni pusi pozitīvo gadījumu, bet 2018. gadā tās īpatsvars ir aptuveni ceturdaļa no pozitīvajiem paraugiem (27. tabula) – un šī atšķirība ir statistiski būtiska ($p < 0,05$). Latvijas biotopu ērcu

pētījumā 2017.-2019. gadā *Bo. garinii* bija otra izplatītākā borēliju suga ar vispārējo prevalenci *I. ricinus* ērcēs 2,58 % (sal. 1,77 % 2018. gada putnu ērcēs – atšķirība nav statistiski būtiska).

Putnu ērcēs otra izplatītākā suga bija *Bo. spielmanii*, sastādot 27,42 % no pozitīvajiem paraugiem ar vispārējo prevalenci 2,15 % (CI 95%: 1,26 % - 3,43%) (27. tabula). Šī suga nebija sastopama 2009. gada putnu ērcēs, kā arī netika konstatēta 2017.-2019. gadā ievāktajās ērcēs. Pirmo reizi Latvijā tika konstatēta arī *Bo. miyamotoi*, tiesa gan, vien divos gadījumos: ērcēs, kas noņemtas jūlija beigās no purva ķauķa un svītrainā ķauķa. Nevar izslēgt iespēju, ka ķauķi varētu būt *Bo. miyamotoi* rezervuāri – par to var liecināt tas, ka viens no *Bo. miyamotoi* pozitīvajiem paraugiem bija pūloti ērcu kāpuri, bet, tā kā borēliju ģints baktērijām raksturīga arī transovariāla pārnese, tas nav pietiekams pierādījums, lai apstiprinātu šādu hipotēzi.

Kopumā ar borēlijām inficētas ērces tika nolasītas no 51 putna, no kuriem deviņi putni bija ar vairāk nekā vienu pozitīvu ērci (26. tabula). Inficētās ērces tika nolasītas no 12 dažādu sugu putniem, un sugas ar vislielāko pozitīvo ērcu skaitu bija melnais mežastrazds (*Turdus merula*) un sarkanrīklīte (*Erithacus rubecula*) (25., 26. tabula). Kopumā visizplatītākā borēliju suga bija *Bo. afzelii*, un ar to inficētās ērces tika nolasītas no vislielākā dažādu sugu putnu skaita (26. tabula). Savukārt *Bo. spielmanii* izteikti dominēja ērcēs, kas nolasītas no melnā mežastrazda, un, tā kā šī borēliju suga netika konstatēta ne 2009. gada putnu ērcēs, ne ar karogošanas metodi ievāktajās ērcēs 2017.-2019. gadā, var izvirzīt hipotēzi, ka melnais mežastrazds ir nesen kļuvis par šī patogēna rezervuāru. *Bo. spielmanii* klātbūtne putnu ērcēs ir jauna tendence; literatūrā tā agrāk aprakstīta kā rets fenomens un putni nav tikuši uzskatīti par šī patogēna rezervuāriem, bet gan grauzēji (Gryczynska and Welc-Faleciak 2016). Arī Dānijas putnu ērcu pētījumā atzīmēts, ka *Bo. spielmanii* prevalence ir izteikti pieaugusi (Klitgaard et al. 2019), un mūsu pētījuma rezultāti apstiprina šādu tendenci Eiropā. Melnais mežastrazds var būt *Bo. garinii*, *Bo. valaisiana* un *Bo. burgdorferi* s.s. rezervuārs, un šajā pētījumā no trim minētajām sugām melno mežastrazdu ērcēs *Bo. garinii* bija otra izplatītākā borēliju suga, bet 2009. gadā Latvijā putnu ērcēs dominējošā *Bo. valaisiana* vairs nebija sastopama. Šādas izmaiņas var ietekmēt dažādi faktori, bet turpmāk pētāms jautājums būtu, kāds ir *Bo. spielmanii* pēdējo gadu izplatības palielināšanās iemesls un vai tas notiek, izkonkurējot tādas iepriekš dominējošas sugas kā *Bo. valaisiana*.

Apskatot putnus, kuriem bija vairāk nekā viena ērce ar apstiprinātu borēliju infekciju, bija novērojams, ka 6 no 9 gadījumiem nolasītās ērces no viena putna bija inficētas ar vienu un to pašu borēliju sugu (2. pielikums), kas var liecināt gan par ērcu inficēšanos *co-feeding* laikā, gan par to, ka kādi no šiem putniem ir bijuši ar aktīvu patogēna infekciju vai pat ir

patogēna rezervuāri. Trīs gadījumos uz viena putna bija ērces ar dažādām borēliju sugām, un vienā gadījumā konstatēta koinfekcija ar *Bo. garinii* un *Bo. spielmanii*.

No 62 borēliju pozitīvajiem gadījumiem 14 paraugi jeb 22,58 % bija no ērcēm kāpura stadijā – šie paraugi bija pūloti, tātad, nav iespējams droši noteikt, vai inficēts bija viens vai vairāki no kāpuriem katrā pozitīvajā paraugā (27. tabula). Šis īpatsvars nav statistiski būtiski atšķirīgs no kāpuru īpatsvara analizētajos paraugos kopumā (20,53 %). Kāpuru inficētība var norādīt uz transovariālo pārnesi (par kuras iespējamību *Bo. burgdorferi s.l.* gadījumā literatūrā ir pretrunīga informācija), kā arī uz to, ka barošanās notikusi no putna, kuram ir sistēmiska infekcija. Atsevišķus gadījumus, kad konstatētas vairākas pozitīvas ērces – gan nimfu, gan kāpuru stadijā – var skaidrot ar putnu kļūšanu par rezervuāriem, vai arī ar kopīgās barošanās (*co-feeding*) ietekmi.

Iegūtie rezultāti par *Borrelia spp.* prevalenci un sugu sastāvu dod iespēju izvirzīt jaunus un relevantus pētījumu mērķus. Viens no neatbildētajiem jautājumiem ir, kādēļ salīdzinoši īsā laikā ir mainījies *Borrelia* sugu sastāvs un proporcijas, un kādēļ putnu ērcu pētījumā un biotopu pētījumā ir nedaudz atšķirīgas sugas. Tādēļ būtu apskatāms, vai lielāka loma ir ekoloģiskiem faktoriem (t.sk. klimatiskiem) vai arī atšķiras konkrēto patogēnu un to celmu virulence un mijiedarbība ar dažādu saimniekorganismu imūnsistēmām. Iegūtie rezultāti arī ļauj izvirzīt hipotēzi, ka konkrētu sugu putni varētu būt kļuvuši par *Borrelia spp.* rezervuāriem, tās apstiprināšanai būtu nepieciešami papildus pētījumi.

3.3. *Babesia spp.* prevalence

Babēzijas bija analizētajā paraugkopā visretāk sastopamais infekcijas aģents. Babēziju pozitīvi paraugi tika konstatēti vien 5 gadījumos (28. tabula) ar prevalenci 0,63 % (CI 95%: 0,21 % - 1,47%). Salīdzinot ar 2009. gada ērcu pētījumu (4 %, n=93), babēziju izplatība ir nedaudz sarukusi (atšķirības ir statistiski būtiskas; p=0,01). Statistiski būtiskas atšķirības (p<0,0005) ir vērojamas arī, salīdzinot ar Latvijas biotopu ērcu pētījumu par laika periodu no 2017. līdz 2019. gadam, kad babēzijas bija sastopamas *I. ricinus* ērcēs 2,53 % gadījumu (n=3840) (Capligina et al. 2020). Babēziju īpatsvars 2018. gada putnu ērcēs (0,63 %) nav statistiski būtiski atšķirīgs no Kaļiņingradas apgabala putnu ērcēm (0,7 %) un Baltkrievijas biotopu ērcēm (1,5 %) (Movila et al. 2013, Reye et al. 2013). Taču 2009. gadā Zviedrijā ievāktajās *I. ricinus* putnu ērcēs babēziju prevalence (2,5 %) bija statistiski būtiski (p<0,005) lielāka (Wilhemsson et al. 2021).

Putni, kuros apstiprināta babēziju klātbūtne.

Table 28

Birds that tested positive for Babesia species.

Nr.	Putna suga	Ērces stadija	Patogēna suga
1	Žubīte	nimfa	<i>B.venatorum</i>
2	Sarkanrīklīte	kāpurs (13)	<i>B.venatorum</i>
3	Sarkanrīklīte	kāpurs (4)	<i>B.capreoli</i>
4	Dziedātājstrazds	nimfa	<i>B.venatorum</i>
5	Dziedātājstrazds	nimfa	<i>B.venatorum</i>

Šajā pētījumā tika identificētas divas babēziju sugas, kuras arī bija sastopamas visu Latviju aptverošajā pētījumā - *Ba. venatorum* un *Ba. capreoli* - kas atrastas ērcēs no trim sugu putniem (28., 29. tabula). Salīdzinot ar 2009. gadu, putnu ērcēs joprojām ir sastopama *Ba. venatorum*, bet *Ba. microti*, kas tika konstatēta gan 2009. gadā, gan 2017.-2019. gada pētījumā, vairs netika konstatēta 2018. gada migrējošo putnu ērcēs. *Babesia divergens*, kas tika konstatēta vienā paraugā 2009. gadā, netika identificēta ne Latvijas biotopu pētījumā 2017.-2019. gada pētījumā, ne šajā darbā par 2018. gada putnu ērcēm, izvirzot pieņēmumu, ka šī suga ir ļoti reti sastopama.

29. tabula

Babēziju sugu prevalence un inficēto ērcu attīstības stadija.

Table 29

Babesia species prevalence and the developmental stage of the infected ticks.

Patogēna suga	Inficēto ērcu skaits	Procenti no pozitīvajiem	Prevalence	Kāpuru skaits	Nimfu skaits	Kāpuru īpatsvars
<i>B.venatorum</i>	4	80%	0,51%	1	3	25%
<i>B.capreoli</i>	1	20%	0,13%	1	0	100%
Kopā	5	100 %	0,63%	2	3	40%

3.4. *Rickettsia spp.* prevalence

Analizējot 788 putnu ērcu DNS paraugus, tika konstatēti 90 pozitīvi *Rickettsia spp.* gadījumi jeb 11,42 % (CI 95%: 9,29 % - 13,85 %). Riketsijas bija visplašāk izplatītā patogēnu ģints šī pētījuma ietvaros, prevalence būtiski neatšķīrās no 2009. gada putnu ērcu rezultātiem (12 %, n=93) (Capligina et al. 2014), bet bija statistiski būtiski mazāka ($p < 0,0001$) nekā Latvijas biotopu ērcēs (19,46 %, n=3840) (Capligina et al. 2020). Atšķirībā no 2009. gada putnu ērcēm, kurās bija sastopamas tikai *Rickettsia helvetica* (Capligina et al. 2014), šajā

pētījumā bija sastopama vēl viena suga: 23,33 % (n=21) no pozitīvajiem riketsju gadījumiem bija *Rickettsia raoultii* (kopējā prevalence paraugos bija 2,66 %).

R. raoultii klātbūtne ērcēs bija sagaidāma, ņemot vērā prevalenci 2017.-2019. gada pētījumā (Capligina et al. 2020), kur tā *I. ricinus* ērcēs bija ievērojami zemāka (2,11 %) nekā *Dermacentor reticulatus* ērcēs (17,82 %). Tomēr mūsu iegūtais rezultāts nav statistiski būtiski atšķirīgs no *R. raoultii* izplatības *I. ricinus* ērcēs Latvijas teritorijā kopumā (Capligina 2020).

Trešā biotopu ērcēs konstatētā suga, kas bija sastopama arī citās Eiropas valstīs, *R. monacensis*, 2018. gada putnu ērcēs netika konstatēta. Tas atbilst zemajai prevalencei biotopu ērcēs (0,13 %, n=5) un liecina, ka šī suga pagaidām nav izplatījusies Latvijas teritorijā. Tas, ka no *Rickettsia* ģints baktērijām dominē *R. helvetica*, atbilst arī citās reģiona valstīs (Igaunijā, Baltkrievijā, Krievijā – Kaļiņigradas apgabalā, Polijā, Zviedrijā) konstatētajam (Katargina et al. 2015, Reye et al. 2013, Movila et al. 2012, Biernat et al. 2016, Elfving et al. 2010).

Riketsijas tika konstatētas 14 dažādu sugu putniem (30. tabula), visvairāk – tām sugām, kurām raksturīgā barošanās vide veicina ērcu piesūkšanos (melns mežastrazds, sarkanrīklīte, mizložņa), kas arī ir vienas no visvairāk pārstāvētajām sugām šajā pētījumā. Vairāk nekā viena ar riketsijām inficēta ērce bija piesūkusies 15 putniem, un divos gadījumos uz vien putna atrastas ērces ar atšķirīgām *Rickettsia* sugām (3. pielikums), kas liecina, ka šo patogēnu izplatības areāls pārklājas.

Kāpuru ar *Rickettsia* infekciju prevalence bija 24,44 % no visiem pozitīvajiem riketsju paraugiem (31. tabula), un tā nebija būtiski lielāka nekā kāpuru īpatsvars visos testētajos paraugos (20,3 %, n=160). Kopumā 2,79 % no analizētajiem kāpuriem uzrādīja pozitīvu uz kādu no *Rickettsia* sugām, salīdzinot ar 8,63 % nimfās. Šāds rezultāts bija sagaidāms, ņemot vērā citos pētījumos (Socolovschi et al. 2009) konstatēto patogēna efektīvo pārneši no ērces matītes pēcnācējiem.

Lai arī *Rickettsia spp.* ir mazāk atkarīgas no mugurkaulnieku rezervuāriem populācijas uzturēšanā, izplatība konkrētu sugu putnu ērcēs rosina pārbaudīt, vai šiem putniem ir raksturīgas sistēmiskas infekcijas ar patogēnu. Šajā ziņā atzīmējama ir mizložņa (*Certhia familiaris*), no kurām nolasītajās ērcēs nav augsts citu patogēnu īpatsvars, taču ir salīdzinoši augsta *Rickettsia spp.* prevalence, un tāpat arī ir liels melno mežastrazdu (*Turdus merula*) ar inficētām ērcēm īpatsvars (30. tabula). Salīdzinot ērcu inficētību abās *Turdus* ģints putnu sugās (melns mežastrazds un dziedātājstrazds), kuras kopumā šajā pētījumā bija pārstāvētas ar lielā skaitā, melnajam mežastrazdam tā ir statistiski būtiski ($p < 0,05$) lielāka.

Riketsiju sugas un putnu sugas, no kurām inficētās ērces ir nolasītas.

Table 30

Rickettsia species and bird species which the infected ticks were collected from.

Putna suga	Putnu skaits		Ērču skaits ar patogēnu	
	Kopā (% no šīs sugas putniem*)	T. sk. ar >1 inficētu ērci	<i>R.helvetica</i>	<i>R.raoultii</i>
Melnais mežastrazds	22 (51,2 %)	7	23	11
Sarkanrīklīte	17 (15,2 %)	2	16	3
Mizložņa	7 (53,8 %)	1	8	1
Dziedātājstrazds	4 (19 %)	3	7	3
Purva ļauķis	3 (10,7 %)	-	3	-
Žubīte	2 (15,4 %)	1	3	-
Lielā zilīte	2 (11,8 %)	1	3	1
Pelēkā zilīte	2 (11,8 %)	-	2	-
Purva ļauķis	1 (3,6 %)	-	1	-
Brūnspārnu ļauķis	1	-	1	-
Zeltgalvītis	1	-	-	1
Peļkājīte	1 (8,3 %)	-	-	1
Ķivulis	1	-	1	-
Erickiņš	1 (10 %)	-	1	-
Kopā	65	15	69	21

*Procenti iekavās norādīti vien tad, ja kopumā pētījumā ir bijis 10 vai vairāk šīs sugas putnu.

Riketsiju sugu prevalence un inficēto ērcu attīstības stadija

Table 31

Rickettsia species prevalence and the developmental stage of the infected ticks

Patogēna suga	Inficēto ērcu skaits	Procenti no pozitīvajiem	Prevalence	Kāpuru skaits	Nimfu skaits	Kāpuru īpatsvars
<i>R. helvetica</i>	69	76,67 %	8,75 %	17	52	24,64 %
<i>R. raoultii</i>	21	23,33 %	2,66 %	5	16	23,81 %
Kopā	90	100 %	11,41%	22	68	24,44 %

3.5. *A. phagocytophilum* prevalence

Putnu ērcu paraugkopā tika konstatēti 6 pozitīvi *A. phagocytophilum* paraugi (32. tabula), kas atbilst 0,76 % (CI 95%: 0,28 % - 1,65 %) no testētajām ērcēm. Salīdzinot ar iepriekš aprakstīto Papes putnu ērcu pētījumu no 2009. gadā ievāktajām ērcēm, patogēna prevalence ir samazinājusies no 2,2 % (Capligina 2014), taču šī atšķirība nav statistiski būtiska. Tā arī nav būtiski mazāka, salīdzinot ar 2017.-2019. gada visu Latvijas teritoriju aptverošo pētījumu ar 1,2 %, un var secināt, ka *A. phagocytophilum* prevalence putnu ērcēs ir līdzīga patogēna prevalencei biotopu ērcēs tajā pašā laika periodā. Iegūtie rezultāti praktiski sakrīt ar Norvēģijas dienvidos veikto migrējošo putnu ērcu pētījumu ar 0,9 % *A. phagocytophilum* gadījumiem (Pedersen et al. 2020), kā arī nav statistiski būtiski atšķirīgi no Kaļiņingradas apgabalā konstatētās prevalences (1,5 %) putnu ērcēs (Movila et al. 2013). Kopumā prevalences rādītāji ir tādi, kādus varētu sagaidīt, spriežot pēc iepriekš veiktajiem pētījumiem.

32. tabula

Paraugi, kuros apstiprināta *A. phagocytophilum* klātbūtne

Table 32

Samples that tested positive for *A. phagocytophilum*

Nr.	Putna suga	Ērces stadija
1	Ezera ļauķis	nimfa
2	Sarkanrīklīte	kāpurs (9)
3	Melnais mežastrazds	nimfa
4	Sarkanrīklīte	nimfa
5	Melnais mežastrazds	nimfa
6	Melnais mežastrazds	nimfa

Pieci no pozitīvajiem paraugiem bija no ērcēm nimfas stadijā, taču viens - apvienotais kāpuru pūls (n=9). Šie kāpuri bija sarkanrīklītei (*Erithacus rubecula*), no kuras netika nolasīta neviena ērce nimfas stadijā. Tādējādi var secināt, ka kāpuri - kuriem, atbilstoši attīstības stadijai, šis putns, visticamāk, bija pirmā barošanās - nav ieguvuši patogēnu *co-feeding* ceļā ar jau inficētu ērci. Tā kā transvariāla *A. phagocytophilum* pārnese netiek uzskatīta par iespējamu, jāsecina, ka inficētais/-ie kāpurs/-i baktēriju ieguvuši no putna asinīm. Tātad, šim putnam iepriekš ir bijusi piesūkusies ar *A. phagocytophilum* inficēta ērce un inficējusi to. ASV veiktajos pētījumos, kas minēti literatūras apskatā, secināts, ka nav izslēdzams, ka putni

varētu būt *A. phagocytophilum* rezervuāri. Pusē no pozitīvajiem gadījumiem (3 no 6) inficētās ērces bija nolasītas no melnā mežastrazda (*Turdus merula*) (trīs dažādiem indivīdiem), bet, tā kā šīs ērces bija nimfas stadijā, šis fakts vien nepierāda, ka šie putni būtu kļuvuši patogēna rezervuāriem, taču šāda iespējamība arī nav izslēdzama.

3.6. *Ca. N. mikurensis* prevalence

Ca. N. mikurensis Latvijā migrējošo putnu ērcēs konstatēts pirmo reizi un tādējādi nav vietējo datu, ar ko salīdzināt iespējamās atšķirības laikā. Šajā pētījumā iegūtā *Ca. N. mikurensis* prevalence sasniedza 4,06 % (CI 95%: 2,79 % - 5,68 %) (33. tabula), taču vidēji Latvijā varētu būt nedaudz lielāks pētāmā patogēna īpatsvars; interpretējot šādus salīdzinājumus, jāņem vērā putnu ērcu attīstības stadija un tas, ka kāpuros transovariālās pārneses neesamības dēļ šis patogēns nav sastopams. Latvijas biotopu ērcu skrīninga (Capligina 2020) paraugos ir analizēta *Ca. N. mikurensis* klātbūtne, kur tā prevalence sasniedza 5,88 % (n=272 no 4627 (gan *I. ricinus*, gan *I. persulcatus* un *D. reticulatus* ērcēs kopā)), taču šie dati nav publicēti (L. Freimanis pers. ziņa).

Jāņem vērā, ka šajā pētījumā tika ievāktas ērces no viena konkrēta reģiona, un tas var izskaidrot novērotās īpatsvara atšķirības. Piemēram, Norvēģijā dažādās ērcu ievākšanas vietās īpatsvars ir variējis no 0 % līdz pat 23 % (Jenkins et al. 2019). Iegūtais īpatsvars (4,06 %) ir statistiski būtiski lielāks ($p < 0,05$) nekā ģeogrāfiski salīdzinoši tuvajā putnu ērcu pētījumā Zviedrijā, kur patogēna prevalence bija 2,1 % (Labbé Sandelin et al. 2015).

Lai arī aptuveni piektdaļa no kopumā testētajiem ērcu paraugiem bija kāpura stadijā, nevienā no tiem netika konstatēta *Ca. N. mikurensis* klātbūtne. Šāds novērojums sakrīt ar vairākumu pētījumu Eiropā, kuros tādēļ secināts, ka, visticamāk, patogēns netiek nodots no ērces mātītes tās pēcnācējiem.

Divos gadījumos no viena putna bija konstatētas vairākas (divas un trīs) inficētas ērcu nimfas (no 29 putniem ar *Ca. N. mikurensis* pozitīvām ērcēm) (33. tabula). Šiem putniem kopumā bija daudz ērcu – melnajam mežastrazdam ar divām pozitīvām ērcēm kopumā tika testētas 17 ērces, bet dziedātājstrazdam ar trim pozitīvām ērcēm kopā tika pārbaudītas 24. Šajā gadījumā nav droši nosakāms, vai putni paši ir kļuvuši par patogēna rezervuāru, vai šīs nimfas jau ir bijušas inficētas pirms tam no cita avota vai arī ieguvušas patogēnu kopīgas barošanās (*co-feeding*) laikā.

Putnu sugas, kuru ērcēs konstatēta *Ca. N. mikurensis*.

Table 33

Bird species with ticks that tested positive for *Ca. N. mikurensis*.

Putna suga	Putnu skaits		Inficēto ērcu skaits
	Kopā	T. sk. ar >1 inficētu ērci	
Melnais mežastrazds	8	1	9
Sarkanrīklīte	7	-	7
Pelēkā zilīte	4	-	4
Dziedātājstrazds	3	1	5
Erickiņš	2	-	2
Purva ļauķis	1	-	1
Zeltgalvītis	1	-	1
Žubīte	1	-	1
Garastīte	1	-	1
Mizložņa	1	-	1
Kopā	29	2	32
<i>Ca. N. mikurensis</i> prevalence			4,06%

3.7. Koinfekcijas

Analizētajā paraugkopā tika identificēts 21 koinfekcijas gadījums putnu ērcēs, tātas 2,66 % no kopējā ērcu skaita (CI 95%: 1,66% - 4,05 %) (34. tabula). Nevienā paraugā netika konstatēta koinfekcija, kurā būtu vairāk nekā divi patogēni. Šajā pētījumā visizplatītākās koinfekcijas – *Rickettsia spp.* un *Borrelia spp.* – ir minētas literatūrā kā iespējami savstarpēji veicinošas infekcijas (Hauck et al. 2020), un tādējādi viens no skaidrojumiem to augstajai prevalencei ir šo baktēriju mijiedarbība, taču nav izslēgta arī konkrētu putnu kļūšana par vairāku patogēnu rezervuāriem. *Rickettsia spp.* un *Borrelia spp.* koinfekciju izplatītākā kombinācija analizētajos paraugos bija *Bo. garinii* + *R. helvetica*, kas bija sastopama trīs paraugos.

Otra izplatītākā koinfekciju kombinācija, *Ca. N. mikurensis* un *Rickettsia* ģints baktērijas, literatūrā nav apskatīta, taču pētījumos par *Ca. N. mikurensis* koinfekcijām ar *Bo. afzelii* izteikta hipotēze, ka šiem patogēniem konkrētajos gadījumos varētu būt izveidojušies kopīgi mugurkaulnieku rezervuāri (Coipan et al. 2013). Arī koinfekciju sugu līmenī visizplatītākā kombinācija bija *Ca. N. mikurensis* + *R. helvetica*, kas atkārtojās četras reizes.

Spriežot pēc *Ca. N. mikurensis* prevalences tieši *Turdus* ģints putnos, ir pieļaujama hipotēze, ka tie dažreiz kļūst ne tikai par *Ca. N. mikurensis* rezervuāriem, bet vienlaikus arī varētu būt *Rickettsia spp.* rezervuāri (4. pielikums). Tā kā melnie mežastrazdi un dziedātājstrazdi kopumā sava dzīvesveida dēļ “uzlasa” vairāk ērcu nekā citi putni, to iespējamība inficēties ar vairāk nekā vienu patogēnu ir attiecīgi lielāka.

Interesanti, ka tādi retāk detektēti patogēni kā *A. phagocytophilum* un *Ba. venatorum*, kuru izplatība paraugkopā bija respektīvi 0,76 % un 0,51 %, bija sastopami arī koinfekcijās. *A. phagocytophilum* bija divu veidu kombinācijās (34. tabula), tātad trešdaļa no *A. phagocytophilum* pozitīvajiem paraugiem bija sastopma mijiedarbībā ar citu patogēnu. Savukārt, *Ba. venatorum* tika konstatēts kombinācijā ar divu veidu borēlijām: *Bo. garinii* un *Bo. afzelii*, sekojoši 50 % no visiem *Ba. venatorum* gadījumiem tika atrasti kombinācijā ar citu patogēnu (4. pielikums).

34. tabula

Identificētās koinfekciju kombinācijas *I. ricinus* ērcēs, kas ievāktas no putniem Papes dabas parkā 2018. gadā migrācijas laikā.

Table 34

Combinations of coinfections detected in *I. ricinus* ticks collected from birds in the Lake Pape Natural Park in 2018.

Kombinācijas: ģints vai suga	Kombināciju atkārtojumu skaits
<i>Borrelia spp.</i> + <i>Rickettsia spp.</i>	9
<i>Ca. N.mikurensis</i> + <i>Rickettsia spp.</i>	6
<i>Borrelia spp.</i> + <i>Babesia spp.</i>	2
<i>Ca. N. mikurensis</i> + <i>Borrelia spp.</i>	2
<i>Ca. N.mikurensis</i> + <i>A. phagocytophilum</i>	1
<i>Borrelia spp.</i> + <i>A. phagocytophilum</i>	1
Kopā	21

SECINĀJUMI

● Visvairāk ērcu tika nolasīts no putniem, kuru barošanās veids padara tos pieejamus ērcu infestācijai – *Turdus* ģints, *Erithacus rubecula* un *Acrocephalus* ģints.

● *Borrelia* sp. prevalence ērcēs bija 7,86 % (konstatētas sugas *Bo. afzelii*, *Bo. spielmanii*, *Bo. garinii* un *Bo. miyamotoi*), un sugu sastāvā notikušās izmaiņas kopš iepriekšējā putnu ērcu pētījuma Latvijā (2009. gads) liecina par dinamiskām borēliju sugu attiecībām. Iespējams izvirzīt hipotēzi, ka daži *Turdus merula* ir kļuvuši par *Bo. spielmanii* rezervuāriem.

● *Babesia* sp. prevalence ērcēs bija 0,63 % (konstatētas sugas *Ba. venatorum* un *Ba. capreoli*) – līdzīga kā tuvākajās valstīs un nedaudz zemāka nekā iepriekšējos Latvijā veiktajos pētījumos.

● *Rickettsia* sp. bija visizplatītākais patogēns šajā pētījumā ar prevalenci 11,42 % (konstatētas sugas *R. helvetica* un *R. raoultii*), un *R. helvetica* lielais īpatsvars apstiprina citos pētījumos konstatēto, ka šī suga dominē plašākā reģionā.

● *Anaplasma phagocytophilum* zemā prevalence (0,76 %) ir līdzīga kā iepriekšējos pētījumos Latvijā un kaimiņvalstīs.

● *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* īpatsvars putnu ērcēs sasniedza 4,06 %. Šim patogēnam nav raksturīga transovariālā pārnese, ko apstiprina pozitīvu gadījumu neesamība ērcu kāpuros.

● Visizplatītākās koinfekciju kombinācijas bija *Borrelia* spp. + *Rickettsia* spp. un *Ca. N. mikurensis* + *Rickettsia* spp. Iespējams, ka dzīves laikā lielā parazitējošo ērcu skaita dēļ dažas putnas sugas ir kļuvušas par vairāku patogēnu rezervuāriem, taču nepieciešams izpētīt arī, vai starp konkrētiem patogēniem nepastāv savstarpēji veicinošas mijiedarbības.

PATEICĪBAS

Vēlos pateikties:

- Darba vadītājām MSc biol. Laumai Freimanei un MSc biol. Agnei Namiņai par metožu iemācīšanu, konsultēšanu un palīdzību bakalaura darba izstrādē;
- Dr. biol. Renātes Rankas grupai Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centrā par ērcu patogēnu datu iegūšanu un konsultācijām;
- Dr. biol. Oskaram Keišam par pētījumā izmantoto putnu ērcu ievākšanu;
- Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centram par nodrošinātajām telpām, aparatūru un reaģentiem;
- Latvijas Genoma centram par paraugu sekvencēšanu.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Andersson M., Bartkova S., Lindestad O., Råberg L. 2013. Co-Infection with “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* Ticks in Southern Sweden. – *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(7):438–442.
2. Biernat B., Stańczak J., Michalik J., Sikora B., Cieniuch S. 2016. *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* infections in immature *Ixodes ricinus* ticks derived from sylvatic passerine birds in west-central Poland. – *Parasitology research*, 115(9):3469-3477.
3. Birkenheuer A.J., Levy M.G., Breitschwerdt E.B. 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. – *Journal of clinical microbiology*, 41(9):4172-4177.
4. Brouqui P., Sanogo Y.O., Caruso G., Merola F., Raoult D. 2003. *Candidatus Ehrlichia walkerii*: a new *Ehrlichia* detected in *Ixodes ricinus* tick collected from asymptomatic humans in Northern Italy. – *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1):134-140.
5. Buczek A., Zając Z., Woźniak A., Kulina D., Bartosik K. 2017. Locomotor activity of adult *Dermacentor reticulatus* ticks (Ixodida: Amblyommidae) in natural conditions. – *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24:271-275.
6. Buczek A.M., Buczek W., Buczek A., Bartosik K. 2020. The potential role of migratory birds in the rapid spread of ticks and tick-borne pathogens in the changing climatic and environmental conditions in Europe. – *International journal of environmental research and public health*, 17(6):2117.
7. Burgdorfer W., Varma M.G.R. 1967. Trans-Stadial and Transovarial Development of Disease Agents in Arthropods. – *Annual Review of Entomology*, 12(1): 347–376.
8. Burri C., Schumann O., Schumann C., Gern L. 2014. Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? – *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(3): 245–251.
9. Capligina V., Salmane I., Keišs O., Vilks K., Japina K., Baumanis V., Ranka R. 2014. Prevalence of tick-borne pathogens in ticks collected from migratory birds in Latvia. – *Ticks and tick-borne diseases*, 5(1): 75-81.
10. Capligina V., Seleznova M., Akopjana S., Freimane L., Lazovska M., Krumins R., Kivrane A., Namina A., Aleinikova D., Kimsis J., Kazarina A. 2020. Large-scale

countrywide screening for tick-borne pathogens in field-collected ticks in Latvia during 2017–2019. – *Parasites & Vectors*, 13(1):1-12.

11. Carret C., Walas F., Carcy B., Grande N., Précigout É., Moubri K., Schetters T.P., Gorenflot A. 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. – *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(3): 298-301.

12. Carroll J. F., Schmidtman E. T. 1996. Dispersal of Blacklegged Tick (Acari: Ixodidae) Nymphs and Adults at the Woods–Pasture Interface. – *Journal of Medical Entomology*, 33(4): 554–558.

13. Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. 1994. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. – *Journal of clinical microbiology*, 32(3):589-595.

14. Chisu V., Foxi C., Masala G. 2018. First molecular detection of the human pathogen *Rickettsia raoultii* and other spotted fever group rickettsiae in Ixodid ticks from wild and domestic mammals. – *Parasitology research*, 117(11):3421-3429.

15. Coipan E.C., Jahfari S., Fonville M., Maassen C.B., van der Giessen J., Takken W., Takumi K., Sprong H. 2013. Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. – *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3:36.

16. Comstedt P., Bergström S., Olsen B., Garpmo U., Marjavaara L., Mejlom H., Barbour A.G., Bunikis J. 2006. Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. – *Emerging infectious diseases*, 12(7):1087.

17. Daniels T.J., Battaly G.R., Liveris D., Falco R.C., Schwartz I. 2002. Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? – *Emerging Infectious Diseases*, 8(12):1524.

18. Dantas-Torres F., Chomel B. B., Otranto D. 2012. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. – *Trends in Parasitology*, 28(10):437-446.

19. Derdákóvá M., Václav R., Pangrácova-Blaňárová L., Selyemová D., Koči J., Walder G., Špitalská E. 2014. Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* and its co-circulation with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks across ecologically different habitats of Central Europe. – *Parasites & Vectors*, 7(1):160.

20. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new

species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. – *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(6):2145-2165.

21. Dumler J.S., Choi K.S., Garcia-Garcia J.C., Barat N.S., Scorpio D.G., Garyu J.W., Grab D.J., Bakken J.S. 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. – *Emerging infectious diseases*, 11(12):1828.

22. Dumler J.S. 2012. The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. – *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 64(1):13-20.

23. Elfving K., Olsen B., Bergström S., Waldenström J., Lundkvist Å., Sjöstedt A., Mejlon H., Nilsson K. 2010. Dissemination of spotted fever rickettsia agents in Europe by migrating birds. – *PLoS One*, 5(1):8572.

24. Estrada-Peña A., Osácar J. J., Pichon B., Gray J. S. 2005. Hosts and Pathogen Detection for Immature Stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. – *Experimental and Applied Acarology*, 37(3-4):257–268.

25. Geller J., Nazarova L., Katargina O., Leivits A., Järvekülg L., Golovljova I. 2013. Tick-borne pathogens in ticks feeding on migratory passerines in western part of Estonia. – *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(7):443-448.

26. Grankvist A., Andersson P. O., Mattsson M., Sender M., Vaht K., Hoper L., Sakiniene E., Trysberg E., Stenson M., Fehr J., Pekova S. 2014. Infections With the Tick-Borne Bacterium “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” Mimic Noninfectious Conditions in Patients With B Cell Malignancies or Autoimmune Diseases. – *Clinical Infectious Diseases*, 58(12):1716–1722.

27. Gray J. S., Dautel H., Estrada-Peña A., Kahl O., Lindgren E. 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. – *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009.

28. Gray J., Zintl A., Hildebrandt A., Hunfeld K.P., Weiss L. 2010. Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. – *Ticks and tick-borne diseases*, 1(1):3-10.

29. Gribble D.H. 1970. *Equine ehrlichiosis*. University of California, Davis, 342 pp.

30. Gryczyńska A., Welc-Fałęciak R. 2016. Long-term study of the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. infection in ticks (*Ixodes ricinus*) feeding on blackbirds (*Turdus merula*) in NE Poland. – *Experimental and Applied Acarology*, 70(3):381-394.

31. Haake D. A., Yang X. F. 2019. Spirochetes. In: *Encyclopedia of Microbiology* (Fourth Edition), Academic Press, 2019, pp 283-298

32. Hasle G., Bjune G. A., Midthjell L., Røed K. H., Leinaas H. P. 2011. Transport of *Ixodes ricinus* infected with *Borrelia* species to Norway by northward-migrating passerine birds. – *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(1):37–43.
33. Hasle G. 2013. Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. – *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3:48.
34. Hauck D., Jordan D., Springer A., Schunack B., Pachnicke S., Fingerle V., Strube C. 2020. Transovarial transmission of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* under field conditions extrapolated from DNA detection in questing larvae. – *Parasites & vectors*, 13(1):1-11.
35. Hornok S., Kováts D., Csörgő T., Meli M.L., Gönczi E., Hadnagy Z., Takács N., Farkas R., Hofmann-Lehmann R. 2014. Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica*. – *Parasites & vectors*, 7(1):1-7.
36. Jahfari S., Fonville M., Hengeveld P., Reusken C., Scholte E.-J., Takken W., Heyman P., Medlock J.M., Heylen D., Kleve J., Sprong H. 2012. Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. – *Parasites & Vectors*, 5(1):1-10.
37. Jenkins A., Raasok C., Pedersen B.N., Jensen K., Andreassen Å., Soleng A., Edgar K.S., Lindstedt H.H., Kjelland V., Stuen S., Hvidsten D. 2019. Detection of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in Norway up to the northern limit of *Ixodes ricinus* distribution using a novel real time PCR test targeting the groEL gene. – *BMC microbiology*, 19(1):1-12.
38. Kantsø B., Svendsen C.B., Jensen P.M., Vennestrøm J., Krogfelt K.A. 2010. Seasonal and habitat variation in the prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks from Denmark. – *Ticks and tick-borne diseases*, 1(2):101-103.
39. Karshima S.N., Ahmed M.I., Kogi C.A., Iliya, P.S 2022. *Anaplasma phagocytophilum* infection rates in questing and host-attached ticks: a global systematic review and meta-analysis. – *Acta Tropica*:106299.
40. Katargina O., Geller J., Ivanova A., Väriv K., Tefanova V., Vene S., Lundkvist Å., Golovljova I. 2015. Detection and identification of *Rickettsia* species in *Ixodes* tick populations from Estonia. – *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6(6):689-694.
41. Kawahara M., Rikihisa Y., Isogai E., Takahashi M., Misumi H., Suto C., Shibata S., Zhang C., Tsuji M. 2004. Ultrastructure and phylogenetic analysis of “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. – *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 54(5):1837–1843.

42. Keesing F., Hersh M.H., Tibbetts M., McHenry D.J., Duerr S., Brunner J., Killilea M., LoGiudice K., Schmidt K.A., Ostfeld R.S. 2012. Reservoir competence of vertebrate hosts for *Anaplasma phagocytophilum*. – *Emerging Infectious Diseases*, 18(12):2013.
43. Klitgaard K., Kjær L.J., Isbrand A., Hansen M.F., Bødker R. 2019. Multiple infections in questing nymphs and adult female *Ixodes ricinus* ticks collected in a recreational forest in Denmark. – *Ticks and tick-borne diseases*, 10(5):1060-1065.
44. Kubiak K., Szczotko M., Dmitryjuk M. 2021. *Borrelia miyamotoi*—An emerging human tick-borne pathogen in Europe. *Microorganisms*, 9(1):154.
45. La Scola B., Raoult, D. 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. – *Journal of clinical microbiology*, 35(11):2715-2727.
46. Lappin M.R., Breitschwerdt E.B., Jensen W.A., Dunnigan B., Rha J.Y., Williams C.R., Brewer M., Fall M. 2004. Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in North America. – *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(6):893-6.
47. Levine N.D. 1988. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. – *The Journal of protozoology*, 35(4):518-520.
48. Madewell B.R., Gribble D.H. 1982. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180(5):512-514.
49. Marsot M., Henry P.Y., Vourc'h G., Gasqui P., Ferquel E., Laignel J., Grysan M., Chapuis J.L. 2012. Which forest bird species are the main hosts of the tick, *Ixodes ricinus*, the vector of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, during the breeding season? – *International journal for parasitology*, 42(8):781-788.
50. Massung R.F., Slater K., Owens J.H., Nicholson W.L., Mather T.N., Solberg V.B., Olson J.G. 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. – *Journal of clinical microbiology*, 36(4):1090-1095.
51. May K., Strube C. 2014. Prevalence of Rickettsiales (*Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.) in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hamburg, Germany. *Parasitology research*, 113(6):2169-2175.
52. McIntosh D., Bezerra R.A., Luz H.R., Faccini J.L.H., Gaiotto F.A., Giné G.A.F., Albuquerque G.R. 2015. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, northeast Brazil. – *Brazilian Journal of Microbiology*, 46: 879-883.

53. Merhej V., Raoult D. 2011. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. – *Biological reviews*, 86(2):379-405.
54. Merhej V., Angelakis E., Socolovschi C., Raoult D. 2014. Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. – *Infection, Genetics and Evolution*, 25:122-137.
55. Michelet L., Delannoy S., Devillers E., Umhang G., Aspan A., Juremalm M., Chirico J., van der Wal F.J., Sprong H., Boye Pihl T.P., Klitgaard K. 2014. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. – *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4:103.
56. Monin R., Gern L., Aeschlimann A. 1989. A Study of the Different Modes of Transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus*. – *Lyme Borreliosis II*, 18:14-20.
57. Movila A., Alekseev A.N., Dubinina H.V., Toderas I. 2013. Detection of tick-borne pathogens in ticks from migratory birds in the Baltic region of Russia. – *Medical and veterinary entomology*, 27(1):113-117.
58. Murray T. S., Shapiro E. D. 2010. Lyme Disease. – *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1):311–328.
59. Naitou H., Kawaguchi D., Nishimura Y., Inayoshi M., Kawamori F., Masuzawa T., Hiroi M., Kurashige H., Kawabata H., Fujita H., Ohashi N. 2006. Molecular identification of *Ehrlichia* species and ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. – *Microbiology and immunology*, 50(1):45-51.
60. Namina A., Capligina V., Seleznova M., Krumins R., Aleinikova D., Kivrane A., Akopjana S., Lazovska M., Berzina I., Ranka R. 2019. Tick-borne pathogens in ticks collected from dogs, Latvia, 2011–2016. – *BMC Veterinary Research*, 15(1):1-10.
61. Nilsson K., Lindquist O., Liu A.J., Jaenson T.G., Friman G., Pålsson C. 1999. *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. – *Journal of clinical microbiology*, 37(2):400-403.
62. Olsén B., Jaenson T.G., Bergström S. 1995. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. – *Applied and environmental microbiology*, 61(8):3082-3087.
63. Parola P., Raoult D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. – *Clinical infectious diseases*, 32(6):897-928.
64. Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P.E., Raoult D., 2013. Update on tick-

borne rickettsioses around the world: a geographic approach. – *Clinical microbiology reviews*, 26(4):657-702.

65. Pedersen B.N., Jenkins A., Kjelland V. 2020. Tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in southern Norway. – *PLoS One*, 15(4):e0230579.

66. Perlman S.J., Hunter M.S., Zchori-Fein E. 2006. The emerging diversity of *Rickettsia*. – *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1598):2097-2106.

67. Pesquera C., Portillo A., Palomar A.M., Oteo J.A. 2015. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. – *Parasites & vectors*, 8(1):1-10.

68. Raoult D., Roux V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. – *Clinical microbiology reviews*, 10(4):694-719.

69. Reye A.L., Stegny V., Mishaeva N.P., Velhin S., Hübschen J.M., Ignatyev G., Muller C.P. 2013. Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. – *PloS one*, 8(1):e54476.

70. Richter D., Matuschka F. R. 2006. Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. – *Applied and environmental microbiology*, 72(7):4627-4632.

71. Richter D., Matuschka F. R. 2011. “Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*,” *Anaplasma phagocytophilum*, and Lyme Disease Spirochetes in Questing European Vector Ticks and in Feeding Ticks Removed from People. – *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3):943–947.

72. Rizzoli A., Silaghi C., Obiegala A., Rudolf I., Hubálek Z., Földvári S. G., Plantard O., Vayssier-Taussat M., Bonnet S., Spitalská E., Kazimírová M. 2014. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: New hazards and relevance for public health. – *Frontiers in public health*, 2:251.

73. Rollend L., Fish D., Childs J. E. 2013. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. – *Ticks and tick-borne diseases*, 4(1-2):46-51.

74. Silaghi C., Woll D., Mahling M., Pfister K., vPfeffer M. 2012. Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, Germany. – *Parasites & Vectors*, 5(1):1-8.

75. Solano-Gallego L., Sainz Á., Roura X., Estrada-Peña A., Miró G. 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. – *Parasites & Vectors*, 9(1),1-18.

76. Socolovschi C., Mediannikov O., Raoult D., Parola P. 2009. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. – *Veterinary research*, 40(2):1-20.
77. Sprong H., Fonville M., van Leeuwen A.D., Devillers E., Ibañez-Justicia A., Stroo A., Hansford K., Cull B., Medlock J., Heyman P., Cochez C. 2019. Detection of pathogens in *Dermacentor reticulatus* in northwestern Europe: evaluation of a high-throughput array. – *Heliyon*, 5(2):e01270.
78. Svendsen C.B., Krogfelt K.A., Jensen P.M. 2009. Detection of *Rickettsia* spp. in Danish ticks (*Acari: Ixodes ricinus*) using real-time PCR. – *Scandinavian journal of infectious diseases*, 41(1):70-72.
79. Tołkacz K., Bednarska M., Alsarraf M., Dwużnik D., Grzybek M., Welc-Fałęciak R., Behnke J.M., Bajer A. 2017. Prevalence, genetic identity and vertical transmission of *Babesia microti* in three naturally infected species of vole, *Microtus* spp.(Cricetidae). – *Parasites & Vectors*, 10(1):1-12.
80. Tonelli B. A., Dearborn D. C. 2019. An individual-based model for the dispersal of *Ixodes scapularis* by ovenbirds and wood thrushes during fall migration. – *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(5):1096-1104.
81. Tufts D.M., Diuk-Wasser M.A. 2018. Transplacental transmission of tick-borne *Babesia microti* in its natural host *Peromyscus leucopus*. – *Parasites & vectors*, 11(1):1-9.
82. Tuvshintulga B., Vannier E., Tayebwa D.S., Gantuya S., Sivakumar T., Guswanto A., Krause P.J., Yokoyama N., Igarashi I. 2020. Clofazimine, a promising drug for the treatment of *Babesia microti* infection in severely immunocompromised hosts. – *The Journal of infectious diseases*, 222(6):1027-1036.
83. Van Pelt-Verkuil E., Van Belkum A., Hays J.P. 2008. Principles and technical aspects of PCR amplification. – In: Springer Science & Business Media.
84. Vannier E., Krause P.J. 2012. Human babesiosis. – *New England Journal of Medicine*, 366(25):2397-2407.
85. Voordouw M.J. 2015. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. – *Parasitology*, 142(2):290-302.
86. Wass L., Grankvist A., Bell-Sakyi L., Bergström M., Ulfhammer E., Lingblom C., Wennerås C. 2019. Cultivation of the causative agent of human neehrlichiosis from clinical isolates identifies vascular endothelium as a target of infection. – *Emerging Microbes & Infections*, 8(1):413–425.

87. Welinder-Olsson C., Kjellin E., Vaht K., Jacobsson S., Wennerås C. 2010. First case of human “Candidatus Neohrlichia mikurensis” infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. – *Journal of Clinical Microbiology*, 48:1956–1959.

88. Wennerås C. 2015. Infections with the tick-borne bacterium Candidatus Neohrlichia mikurensis. – *Clinical Microbiology and Infection*, 21(7):621–630.

89. Wilhelmsson P., Lindblom P., Fryland L., Nyman D., Jaenson T.G., Forsberg P., Lindgren P.E. 2013. Ixodes ricinus ticks removed from humans in Northern Europe: seasonal pattern of infestation, attachment sites and duration of feeding. – *Parasites & vectors*, 6(1):1-11.

90. Wilhelmsson P., Pawelczyk O., Jaenson T.G., Waldenström J., Olsen B., Forsberg P., Lindgren P.E. 2021. Three Babesia species in Ixodes ricinus ticks from migratory birds in Sweden. – *Parasites & vectors*, 14(1):1-10.

91. Woldehiwet Z. 2010. The natural history of Anaplasma phagocytophilum. – *Veterinary parasitology*, 167(2-4):108-122.

92. Wolcott K.A., Margos G., Fingerle V., Becker N.S. 2021. Host association of Borrelia burgdorferi sensu lato: A review. – *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(5):101766.

93. Yabsley M. J., Murphy S. M., Luttrell M. P., Wilcox B. R., Ruckdeschel C. 2008. Raccoons (Procyon lotor), but not rodents, are natural and experimental hosts for an ehrlichial organism related to “Candidatus Neohrlichia mikurensis.” – *Veterinary Microbiology*, 131(3-4):301–308.

94. Øines Ø., Radzijeuskaja J., Paulauskas A., Rosef O, 2012. Prevalence and diversity of Babesia spp. in questing Ixodes ricinus ticks from Norway. – *Parasites & vectors*, 5(1):1-8.

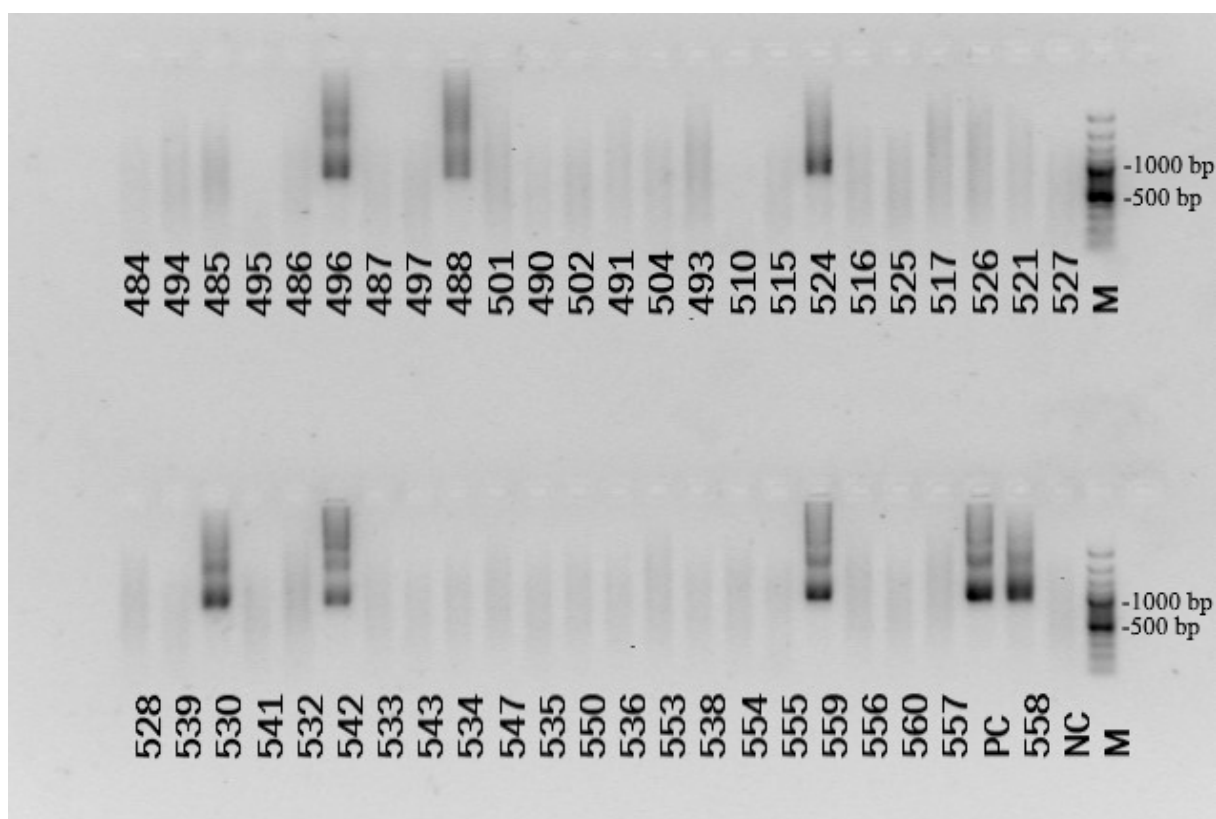
Programatūra

95. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

96. Frank E Harrell Jr, with contributions from Charles Dupont and many others. (2021). Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 4.5-0. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>

97. Tiešsaistes programmatūras GraphPad divpusējais eksaktais Fišera tests (*Fisher's exact test*). URL: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>

PIELIKUMI



1. attēls. *Rickettsia spp.* PCR ampliconu (898 bp) vizualizācija agarozes gēlā. Pozitīvi paraugi numur 496, 488, 524, 530, 542, 558 un 559. PC - pozitīvā kontrole, NC - negatīvā kontrole, M - DNS Garuma marķieris (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, ASV*).

Image 1. *Rickettsia spp.* PCR amplicons (898 bp) showed in agarosis gel. Positive samples nr.: 496, 488, 524, 530, 542, 558 and 559. PC - positive control, NC - negative control, M - DNA ladder (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, ASV*).

Putni ar vairākām ar *Borrelia spp.* inficētām ērcēm. K- kāpurs; N - nimfa.

Table 35

Birds with more than one *Borrelia spp.* infected ticks. K - larvae; N - nymphs.

Suga	Ērces stadija	Īpatņu skaits	Patogēns
Melnais mežastrazds	N	1	<i>B.garinii</i> + <i>B.spielmanii</i>
	N	1	<i>B.garinii</i>
Melnais mežastrazds	N	2	<i>B.garinii</i>
Melnais mežastrazds	N	2	<i>B.afzelii</i>
Melnais mežastrazds	N	3	<i>B.spielmanii</i>
Melnais mežastrazds	N	1	<i>B.afzelii</i>
	N	1	<i>B.garinii</i>
Melnais mežastrazds	K*	3	<i>B.spielmanii</i>
	N	2	<i>B.spielmanii</i>
Melnais mežastrazds	K	5	<i>B.spielmanii</i>
	N	1	<i>B.garinii</i>
Dziedātājstrazds	K	5	<i>B.afzelii</i>
	N	1	<i>B.afzelii</i>
Dziedātājstrazds	N	2	<i>B.afzelii</i>

* Kāpuri no viena putna bija apvienoti, testēti kā viens paraugs.

Putni ar vairākām ar *Rickettsia spp.* inficētām ērcēm. K- kāpurs; N - nimfa.

Table 36

Birds with more than one *Rickettsia spp.* infected ticks. K - larvae; N - nymphs.

Suga	Ērces stadija	Īpatņu skaits	Patogēns
Melnais mežastrazds	N	5	<i>R. helvetica</i>
Melnais mežastrazds	N	2	<i>R. helvetica</i>
Melnais mežastrazds	N	2	<i>R. helvetica</i>
Melnais mežastrazds	N	2	<i>R. helvetica</i>
Melnais mežastrazds	N	2	<i>R. raoultii</i>
	K*	6	<i>R. raoultii</i>
Melnais mežastrazds	K	5	<i>R. raoultii</i>
	N	1	<i>R. raoultii</i>
Melnais mežastrazds	N	2	<i>R. raoultii</i>
	N	1	<i>R. helvetica</i>
Dziedātājstrazds	N	3	<i>R. helvetica</i>
	K	7	<i>R. helvetica</i>
Dziedātājstrazds	K	2	<i>R. helvetica</i>
	N	1	<i>R. helvetica</i>
Dziedātājstrazds	N	2	<i>R. raoultii</i>
	K	2	<i>R. raoultii</i>
Sarkanrīklīte	K	7	<i>R. helvetica</i>
	N	1	<i>R. helvetica</i>
Sarkanrīklīte	N	1	<i>R. raoultii</i>
	K	10	<i>R. helvetica</i>
Mizložņa	N	3	<i>R. helvetica</i>
Lielā zīlīte	N	3	<i>R. helvetica</i>
Žubīte	K	1	<i>R. helvetica</i>
	N	1	<i>R. helvetica</i>

* Kāpuri no viena putna bija apvienoti, testēti kā viens paraugs.

Identificētie koinfekciju gadījumi *I. ricinus* ērcēs, kas ievāktas no putniem Papes dabas parkā 2018. gadā migrācijas laikā. K- kāpurs; N - nimfa

Table 37

Cases of coinfections detected in *I. ricinus* ticks collected from birds in the Lake Pape Natural Park in 2018. K - larvae; N - nymphs.

Putna suga	Koinfekcijas			
	Sezona	Ērces stadija	Patogēns 1	Patogēns 2
Dziedātājstrazds	Rudens	N	<i>Bo. garinii</i>	<i>Ba. venatorum</i>
	Rudens	N	<i>Bo. afzelii</i>	<i>Ba. venatorum</i>
	Rudens	N	<i>Ca.N.mikurensis</i>	<i>R. helvetica</i>
	Rudens	N	<i>Ca.N.mikurensis</i>	<i>R. raoultii</i>
Melnsais mežastrazds	Rudens	N	<i>Bo. garinii</i>	<i>R. helvetica</i>
	Rudens	N	<i>Ca.N.mikurensis</i>	<i>R. helvetica</i>
	Rudens	N	<i>Ca.N.mikurensis</i>	<i>A.phagocytophilum</i>
	Rudens	N	<i>Bo. garinii</i>	<i>R. helvetica</i>
	Rudens	N	<i>Ca.N.mikurensis</i>	<i>Bo. spielmanii</i>
	Rudens	K (1)	<i>Bo. spielmanii</i>	<i>R. raoultii</i>
	Rudens	K (5)	<i>Bo. spielmanii</i>	<i>R. raoultii</i>
Mizložņa	Rudens	N	<i>Bo. spielmanii</i>	<i>R. helvetica</i>
	Rudens	N	<i>Ca.N.mikurensis</i>	<i>R. helvetica</i>
Sarkanriklīte	Rudens	K (9)	<i>Bo. garinii</i>	<i>A.phagocytophilum</i>
	Rudens	K (5)	<i>Bo. spielmanii</i>	<i>R. helvetica</i>
	Rudens	N	<i>Ca.N.mikurensis</i>	<i>Bo. afzelii</i>
	Rudens	K (10)	<i>Bo. afzelii</i>	<i>R. helvetica</i>
Zeltgalvītis	Rudens	N	<i>Ca.N.mikurensis</i>	<i>R. raoultii</i>
Žubīte	Rudens	N	<i>Bo. garinii</i>	<i>R. helvetica</i>
Brūnspārnu ķauķis	Vasara	N	<i>Bo. afzelii</i>	<i>R. helvetica</i>

Bakalaura darbs „Patogēnu prevalence migrējošo putnu ērcēs 2018. gadā Papē”
izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie
informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: Alise Birnbauma 27.05.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājas: MSc .biol. Laume Freimane 27.05.2022.

MSc. biol. Agne Namiņa 27.05.2022.

Recenzente: MSc .biol. Maija Rozenberga

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 27.05.2022.

Lietvede:

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: